

Humboldt-Universität zu Berlin

DISSERTATION

**Ausgewählte Eigenschaften des  
Sporopollenins der Kiefer**

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium  
(Dr. rer. nat.)

im Fach Biologie

eingereicht an der  
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I

von

Diplom-Biologe Guido Böhne

geboren am 29. Juli 1968 in Kassel

Prof. Dr. Christian Limberg

Gutachter:     1. Prof. Dr. Rudolf Ehwald  
                  2. PD Dr. Kurt Zoglauer  
                  3. Prof. Dr. Günther Fuhr

eingereicht:         29.11.2006

Datum der Promotion:     26.02.2007

## Zusammenfassung

Physiologisch bedeutsame und biotechnologisch interessierende Eigenschaften der Exine wurden an dreiteiligen Sporopolleninmikrokapseln, die aus Pollen der Kiefer (*Pinus sylvestris* L. und *P. nigra* ARNOLD) präpariert wurden, analysiert. Aus den durchgeführten Experimenten lassen sich folgende Ergebnisse ableiten:

Die Exine ist hydrophil und amphiphil. Sporopollenin ist mit Wasser gut benetzbar; sein Grenzwinkel mit Wasser ist jedoch deutlich größer als derjenige mit Ethanol. Sporopollenin quillt in Wasser nur geringfügig ( $0,2 \text{ g g}^{-1} \text{ TM}$ ), etwa 20fach schwächer als eine pflanzliche Primärwand. Polare und apolare Lösungsmittel wie Aceton oder n-Heptan, die keine Wasserstoffbrücken ausbilden, werden durch das Sporopollenin der Kiefer in noch geringeren Mengen als Wasser absorbiert, während Ethanol ein besseres Quellungsmittel als Wasser ist. Die Affinität des Sporopollenins zu den untersuchten Flüssigkeiten wird vermutlich durch hydrophobe Wechselwirkungen und Wasserstoffbrücken bestimmt.

Das Sporopollenin der Kiefer enthält neben aliphatischen und aromatischen Domänen dissoziationsfähige mehr oder weniger schwach saure Gruppen (Carboxylgruppen und phenolische Hydroxylgruppen) in hoher Konzentration.

Nach Entfernen der Sporoplasten durch Entfettung, saure Hydrolyse und nachfolgende Extraktionsschritte wurden leere Zentralkapseln erhalten, die einen strikt membrankontrollierten Austausch mit niedermolekularen Nichtelektrolyten zeigten. Die Halbwertszeiten für die Gleichgewichtseinstellung mit der Zentralkapsel liegen im Bereich von Sekunden (Methanol, Ethanol), Minuten (Mono- und Oligosaccharide) bis Tagen (Dextrane mit  $r_s$  bis  $2,5 \text{ nm}$ ).

Obwohl in der gequollenen Sporopolleninmatrix etwa 85 % des relativ kleinen, wassergefüllten Porenraumes für Monosaccharide leicht zugänglich ist, stellte sich das Dissoziationsgleichgewicht mit den isolierten Exinefragmenten nach einer Änderung des äußeren pH-Wertes verzögert ein. Ein Teil der dissoziationsfähigen Gruppen ist daher für den Kationenaustausch nur schwer zugänglich.

Die Schichten der Exine des Kiefernpollens unterscheiden sich stark in ihren Permeabilitätseigenschaften. Die Größenausschlussgrenze der die Luftsäcke formenden Sexine liegt mit über  $0,2 \text{ }\mu\text{m}$  etwa 50fach höher als die der vollständigen Exine (Sexine plus Nexine), die den Corpus umgibt. Dextranmoleküle mit einem Stokes' schen Radius ( $r_s$ ) über  $2,5 \text{ nm}$  sowie der anionische Farbstoff Evans Blau ( $r_s = 1,3 \text{ nm}$ , vier Sulfonatgruppen) permeieren nur sehr langsam durch die vollständige Exine.

Die Druckbelastbarkeit von chromatographischen Betten, die aus gereinigten, wassergesättigten Sporopolleninkapseln bestehen, ist so hoch, dass eine hocheffiziente Chromatographie mit diesen Kapseln möglich ist. Der Fließwiderstand von  $30 \text{ cm}$  langen FPLC-Säulen, die mit diesen Kapseln gefüllt wurden, bleibt selbst bei Druckdifferenzen von mehr als  $15 \text{ kPa}$  von der Fließgeschwindigkeit unabhängig. Die guten Packungseigenschaften der Kapseln ermöglichen eine effiziente chromatographische Trennung hochmolekularer Stoffe an Hand ihres Ausschlusses von den Luftsäcken.

Die günstige Partikelgröße und die Homogenität der aus Sporopolleninkapseln gepackten Festbetten war eine Voraussetzung für die Messung der Permeabilität der inneren Exineschichten (Nexine) für Alkohole und Salze mit der chromatographisch-kinetischen Methode nach Giddings [1965]. Die für die Zentralkapsel gefundene Abhängigkeit der Permeabilitätskoeffizienten vom Stokes' schen Radius bzw. von der Molekülmasse offenbart, dass in der permeabilitätsbegrenzenden Schicht der Exine relativ große Poren (einer Ultrafiltermembran entsprechend) mit sehr geringem Flächenanteil und sehr engen Poren (einer Umkehrosmosemembran entsprechend) mit weit größerem Flächenanteil vorkommen. Die Permeabilitätskoeffizienten der intakten Kiefernexine für kleinere Polymermoleküle sind nur in Langzeitexperimenten messbar; die Ausschlussgrenze liegt dabei bei einem Stokes' schen Radius von über  $4,5 \text{ nm}$ .

In Lösungen permeabler Osmolyte (Salze und Zucker) schrumpft die dem Corpus entsprechende Zentralkapsel der Sporopolleninkapseln nur vorübergehend, in Natriumpolyacrylat ( $M_r = 2100 \text{ g mol}^{-1}$ ) jedoch dauerhaft. Natriumsulfatlösungen (Reflexionskoeffizient zwischen  $0,5$  und  $0,7$ ) erzeugten einen deutlich schwächeren osmotischen Fluss durch die Exine als isotonische Natriumpolyacrylatlösungen. Die hydraulische Leitfähigkeit der Exine ( $L_p = 0,39\text{--}0,48 \text{ }\mu\text{m s}^{-1} \text{ MPa}^{-1}$ ) liegt in der Größenordnung, die von Biomembranen bekannt ist. Die Exine bietet daher keinen nennenswerten Verdunstungsschutz. Weder die gereinigte Exine noch die native Pollenwand behindern die Wasseraufnahme stark. Die Halbwertszeit für die Quellung lufttrockener Pollenkörner in einer  $20 \text{ mM}$  Calciumchlorid-Lösung beträgt weniger als  $2 \text{ min}$ . Ein Absenken des osmotischen Potentials durch  $0,2 \text{ M}$  Polyethylenglykol ( $200 \text{ g mol}^{-1}$ ) verzögert die Wasseraufnahme merklich, und dies bereits in einer frühen Phase des Quellvorgangs, wenn die Konzentration der im Sporoplasten ge-

lösten Teilchen sehr hoch sein sollte. Diese Potentialabsenkung hat aber keinen signifikanten Einfluss auf das maximale Quellungsvolumen ( $1,6 \text{ g H}_2\text{O g}^{-1} \text{ TM}$ ). Es ist daher zu vermuten, dass in der Anfangsphase der Quellung nicht alle gelösten Teilchen in diffusionsfähiger Form vorliegen.

Vitale, ungelagerte Pollen verlieren bei der Quellung in Wasser nur einen geringen Anteil (wenige Prozent) des extrahierbaren Zuckers. Wurde der Sporoplast schonend denaturiert, erfolgte der Saccharoseefflux mit ähnlicher Kinetik wie aus mit Saccharose vorgesättigten Sporopolleninkapseln. Erfolgte die Quellung des trockenen, vitalen Pollen in Anwesenheit calciumbindender Chelatoren (EDTA) oder bei niedrigem pH-Wert, kam es zur schnellen Abgabe beträchtlicher Mengen von Saccharose, die auf den osmotischen Zusammenbruch der Plasmamembran, zumindest bei einem Teil der Sporoplasten, hinweist. Diesem schnellen Zusammenbruch kann man durch Absenken des osmotischen Potentials entgegenwirken. Die Schutzwirkung des Osmotikums beruht nicht primär auf Absenkung des Turgors, sondern auf einer Verzögerung der Flächenausdehnung der Plasmamembran. Erfolgte letztere mit hoher Geschwindigkeit, so unterblieb der osmotische Zusammenbruch nur in Anwesenheit von Calciumionen. Dies wird dadurch nahegelegt, dass die Zugabe des Chelators zu gequollenen Pollen weit weniger membranschädigend wirkte, wenn der Quellungsvorgang bereits beendet war.

Im Unterschied zu Lignin, welches stets kovalent mit der Pectinwand verbunden ist, bildet das Sporopollenin der Exine eine Schicht, die mit der Intine nur locker verbunden ist. Dies wird deutlich, wenn inaperturate Pollen langsam mit einem Osmolyten bis zu sehr hohen Konzentrationen beladen und anschließend einem hypotonischen Schock ausgesetzt werden. In diesem Fall wird der Sporoplast mit der ihn umgebenden Intine aus der berstenden Exine herausgeschleudert oder nach dem Platzen der inneren Exineschichten in die Sacci hineingepresst.

Die Formänderungen, die Kiefernpollen bei der Quellung erfahren, werden v.a. durch die Struktur der Exine bestimmt. Sie verhindern, dass in der Anfangsphase des Quellungsvorganges, in welcher die Volumenänderung besonders schnell verläuft, eine Flächenausdehnung der Plasmamembran erfolgt. Am distalen Pol des Corpus (Ventralseite) eines lufttrockenen Korns ist die Exine am Leptom konkav eingefaltet. Während das Korn quillt, wird die resultierende Änderung der Gestalt von konkav zu konvex durch Entfalten des Leptoms vermittelt. Für das Überleben der Sporoplasten ist auf Grund der quellungsbedingten, starken Formänderungen wahrscheinlich die geringe Haftung zwischen Intine und Exine funktionell wichtig.

Im Gegensatz zur Zentralkapsel bzw. zum Corpus des lebenden Korns schrumpfen die Luftsäcke (Sacci) beim Trocknen nicht, weil die Stützsicht (Columellae) der - mit dem Gaseintritt auftretenden - Kohäsionsspannung standhält. Letztere ist dadurch begrenzt, dass die Poren des Tectums einen Durchmesser von etwa  $0,2 \mu\text{m}$  aufweisen.

## Abstract

Tripartite sporopollenin-microcapsules prepared of pine pollen (*Pinus sylvestris* L. and *P. nigra* AR-NOLD) were analysed regarding physiologically important and biotechnologically interesting properties of the exine. The following conclusions have been drawn from the results:

The exine is both hydrophilic and amphiphilic. Sporopollenin is well wettable by water, its contact angle to water, however, is higher than that to ethanol. Sporopollenin hardly swells in water ( $0.2 \text{ g g}^{-1}$  dry mass), about 20 times less than a primary plant cell wall. Solvents - no matter whether polar as acetone, or apolar as n-heptane - were absorbed by sporopollenin to a still lesser extent than water was, whereas ethanol is the better swelling agent compared to water. The affinity of sporopollenin to the investigated liquids is presumably determined by both hydrophobic interactions and hydrogen bonds. In addition to aliphatic and aromatic domains, pine sporopollenin contains high concentrations of more or less weak acid groups which are able to dissociate (carboxyl groups, phenolic hydroxyl groups).

The empty central capsule that is obtained after removal of the sporoplast by extracting procedures comprising degreasing and acid hydrolysis of polymers presents a strictly membrane-controlled exchange of low-molecular weight non-electrolytes. The half-life periods of permeant molecules needed to achieve equilibrium with the central capsule ranged from seconds (methanol and ethanol), minutes (mono- and oligosaccharides) to days (dextrans with Stokes' radius up to  $2.5 \text{ nm}$ ).

About 85 % of the small aqueous pore space in the swollen sporopollenineous matrix is well accessible to monosaccharides, notwithstanding dissociation equilibrium was reached decelerated

following alterations of the external pH in isolated exine fragments. Thus a portion of the dissociable groups is difficult to access for cation exchange.

The exine layers of pine pollen differ strongly in permeability properties. The size exclusion limit of the sexine forming the air-bags is in excess of 0.2  $\mu\text{m}$  amounting 50-fold of the complete exine (sexine plus nexine) bordering the corpus. Both dextran molecules with Stokes' radii ( $r_s$ ) in excess of 2.5 nm and the anionic dye Evans Blue ( $r_s = 1.3$  nm, four sulfonate groups) do permeate the intact exine very slowly.

The pressure limit of chromatographic beds, consisting in packed sporopollenin microcapsules saturated with water, is so high that efficient chromatography with those capsules is rendered feasible. The flow resistance of FPLC-columns, filled with those capsules up to the height of 30 cm, remain independent of the flow rate, even at pressure differences exceeding 15 kPa. The approved packing-properties of the capsule afford an efficient chromatographic separation of high-molecular-weight substances subjected to exclusion from the sacci.

The favourable particle size and homogeneity of the solid beds, comprised of sporopollenin capsules, was a prerequisite for measuring the permeability of the inner exine layers (nexine) for alcohols and salts according to the chromatographic-kinetic method developed by Giddings [1965]. The found dependence of the permeability coefficients on Stokes' radius or molecular mass revealed, that the exine layer confining permeability features a few major pores in the ultrafilter range with a very low area share, whereas water uptake is dominated by many narrow pores in the range characteristic for reverse osmosis.

In solutions of permeable osmolytes the central capsule, that corresponds to the corpus, shrinks only transiently, however in sodium polyacrylate ( $M_r = 2100 \text{ g mol}^{-1}$ ) shrinkage persists. Solutions of sodium sulfate (reflection coefficient varied from 0.5 to 0.7) caused an osmotic flow through the exine, that was distinctly weaker than the one caused by isotonic solutions of sodium polyacrylate. The hydraulic conductivity of the exine ( $L_p = 0.39\text{-}0.48 \mu\text{m s}^{-1} \text{MPa}^{-1}$ ) ranges in the order of magnitude typical for biomembranes. The exine does not offer a noteworthy protection from evaporation.

Neither the purified exine nor the native pollen wall do significantly constrict water uptake. The half-value time of moisture expansion of air-dry pollen grains imbibing a solution of 20 mM calcium chloride averages less than 2 min. Lowering the osmotic potential by adding 0.2 M polyethylene glycol ( $200 \text{ g mol}^{-1}$ ) decelerated the water uptake severely, even in the initial phase of swelling when the concentration of internal solutes should still be high. However, the final swelling volume ( $1.6 \text{ g H}_2\text{O g}^{-1} \text{DM}$ ) was not significantly diminished by the osmolyte. It may be concluded, that not all sporoplastic solutes of the grain are in a diffusible state shortly after the outset of rehydration.

Vital, non-stored pollen lost very small fractions of extractable sugars when swelling in water, whereas the sugar efflux of denatured pollen grains corresponded well to the efflux kinetics of pre-saturated purified capsules. If volume expansion of dry vital pollen proceeded in the presence of calcium-binding chelators (EDTA) or at low pH, substantial amounts of sucrose have been released rapidly, suggesting osmotic breakdown of the plasma membrane to occur. This breakdown may be counteracted by means of lowering the osmotic potential. The protective effect of the osmolyte is not due to turgor reduction but rather the result of the area expansion of plasma membrane being decelerated. At high rates, the latter was feasible without membrane breakdown, in the presence of calcium ions. It stands to reason, that EDTA was affecting the membrane integrity to a much lesser extent when added to turgid pollen.

Unlike lignin, which is always covalently bound to a pectinous wall, the sporopollenin of the exine is a layer connected only loosely to the intine. This becomes apparent, if inaperturate pollen was slowly loaded with osmolytes up to very high concentrations and subsequently exposed to a hypotonic shock. In this case the exine rupture and the sporoplast is ejected along with the surrounding intine or it is being forced into the saccus.

The shapings of pine pollen upon swelling are defined by the structure of the exine. They prevent that area expansion of the plasma membrane occurs in the initial phase of swelling in which the change of volume proceeds exceptionally fast. At the distal pole of the corpus of an air-dry grain, the exine is enfolded (ventral face). While the grain swells the transition of shape at the leptom from concave to convex allows for a rapid increase in volume without having the surface area of plasma membranes to increase. The weak adhesion between intine and exine is probably functionally relevant for the shaping of exine and sporoplast.

Contrary to the central capsule, respectively the corpus of the living grain, shrinkage of the air-bags (sacci) does not occur upon dehydration, since the supporting layer (columellae) of the sacci does well resist the cohesion-tension caused by entrance of gas into the initially liquid-filled lumen. The cohesion-tension is restricted by the presence of pores in the tectum of about 0.2  $\mu\text{m}$  diameter.

Schlagwörter:

Benetzbarkeit, Calcium, Chromatographie, Deplasmolyse, Dextran, Diffusion, Evans Blau, Exine, Exocytose, Größenausschluss, HETP, hydraulische Leitfähigkeit, hypo-osmotischer Schock, Intine, Kiefer, Leptom, Nexine, osmotischer Schock, Parenchymzellen, Permeabilität, *Pinus sylvestris* L., *Pinus nigra* Arnold, Plasmamembran, Plasmoptyse, Pollen, Poren, Reflexionskoeffizient, Sexine, Sporopollenin, Ultrafilterkoeffizient, Wasserabsorption, Wasseraufnahme, Zucker

Keywords:

Calcium, chromatography, de-plasmolysis, dextran, diffusion, Evans Blue, exine, exocytosis, HETP, hydraulic conductivity, hypo-osmotic shock, intine, leptom, nexine, osmotic shock, parenchyma cells, permeability, pine, *Pinus nigra* Arnold, *Pinus sylvestris* L., plasma membrane, plasmoptysis, pollen, pores, reflection coefficient, sexine, size exclusion, sporopollenin, sugars, ultrafilter coefficient, water absorption, water uptake, wettability

## Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	2
Abstract	3
Abkürzungsverzeichnis	8
Vorwort	9
1 Einleitung	10
2 Aufgabenstellung	16
3 Material und Methoden	17
3.1 Geräte und Chemikalien	17
3.1.1 Geräte	17
3.1.2 Chemikalien	17
3.2 Pollen und Sporopolleninkapseln	17
3.2.1 Ernte	17
3.2.2 Sporopolleninkapseln	18
3.2.3 Größenmessung der Zentralkapsel	18
3.2.4 Fragmentierung präparierter Exinen	18
3.2.5 Osmotisch induziertes Sprengen der Zentralkapsel	18
3.2.6 Füllen der Sacci mit Siliconöl	19
3.3 Volumen der Zentralkapseln, bezogen auf die Feuchtmasse filtrierter Sporopolleninkapseln	19
3.4 Polarimetrische Aufzeichnung der Permeation optisch aktiver Stoffe und des Wassers	19
3.5 Gelchromatographische Permeatanalyse zur Erfassung von Permeabilitätskoeffizienten von Dextrangrößenfraktionen	20
3.6 Größenausschlusschromatographie mit Sporopolleninkapseln	21
3.6.1 Füllen der Chromatographiesäulen	21
3.6.2 Analyse der Chromatogramme: Flussratenabhängige Peakverbreiterung bei Elution von (niedermolekularen) Lösungen an gepackten Sporopolleninkapseln	21
3.7 Initialraten der osmotisch induzierten Wasserabgabe aus wassergesättigten Zentralkapseln	22
3.8 Konzentrationsänderung beim Quellen trockener Exinefragmente in Dextran- und Zuckerlösungen	22
3.9 Gas-Durchbruchspannung an flüssigkeitsgesättigten Säulenfüllungen von Sporopolleninkapseln	23
3.10 Gravimetrische Evaporationsmessung	23
3.11 Titration	23
3.12 Mikroskopische Techniken	23
3.13 Analyse der Formänderung bei der Rehydratation vitaler Pollenkörner	23
3.14 Vitalitätsbestimmung von Pollen	24
3.15 Osmometrie, Analytik	24
4 Ergebnisse	25
4.1 Untersuchungen an Sporopolleninkapseln	25
4.1.1 Permeation von niedermolekularen Substanzen, Polymeren und Partikeln	25

4.1.1.1	Zentralkapsel und Luftsäcke	25
4.1.1.2	Permeation von niedermolekularen Farbstoffen sowie markierten Makromolekülen und Mikropartikeln	27
4.1.1.3	Permeation von Dextran T70 und Zuckern	28
4.1.1.4	Permeabilitätskoeffizienten von niedermolekularen Substanzen an der Zentralkapsel (Nexine) von gepackten Sporopolleninkapseln anhand der kinetischen Peakverbreiterung	35
4.1.2	Weitere physiko-chemische Eigenschaften des Sporopollenins	42
4.1.2.1	Adhäsion von Wasser, Alkanolen und n-Heptan	42
4.1.2.2	Quellung getrockneter Kapseln in Ethanol, Wasser, Aceton und n-Heptan	44
4.1.2.3	Absorption von Wasser und Verteilung gelöster Stoffe in gequollenem Sporopollenin	46
4.1.2.4	Titrationen von wässrigen Suspensionen der Sporopolleninkapseln	48
4.1.3	Hydraulische Leitfähigkeit der Nexine und osmotische Eigenschaften der Zentralkapsel	49
4.1.3.1	Trocknungsexperimente: Evaporation von hydrierten Sporopolleninkapseln und von gequollenen, reifen Pollenkörnern	49
4.1.3.2	Osmotisch induziertes Schrumpfen der wassergefüllten Zentralkapsel	50
4.1.3.3	Hydraulische Leitfähigkeit und Reflexionskoeffizient	53
4.1.3.4	Osmotisch erzeugtes Platzen der Zentralkapsel	55
4.2	Untersuchungen an vitalen, reifen Pollenkörnern	56
4.2.1	Bemerkungen zur Übertragbarkeit der Wasseraufnahmemessung von isolierten Exinen auf reife Pollenkörner	56
4.2.2	Formänderung bei der Wasseraufnahme: Entfaltung der ventralen Exine	56
4.2.3	Zuckerabgabe	58
4.2.4	Wasseraufnahmekinetik	61
5	Diskussion	64
5.1	Physiologisch wichtige Materialeigenschaften des Sporopollenins in Beziehung zu möglichen biotechnologischen Anwendungen	64
5.1.1	Absorptionsvermögen und Benetzbarkeit für unterschiedliche Flüssigkeiten	64
5.1.2	Permeabilität der Exine im Vergleich mit anderen Membranen	66
5.1.2.1	Die inaperturate Nexine der Kiefernpollen als hydrophile Porenmembran mit begrenzter Permeabilität für gelöste Salze und Nichteletrolyte	66
5.1.2.2	Die Sexine der Luftsäcke als poröse Mikrofiltrationsmembran mit scharfer Größenausschlussgrenze und hoher Permeabilität für Proteine	68
5.1.3	Harmomegathie und ihre Bedeutung für die Rehydratation	69
	Literaturverzeichnis	70
	Anhang	80
	Abbildungsverzeichnis	80
	Tabellenverzeichnis	84
	Liste der Publikationen	86
	Danksagung	87
	Eidesstattliche Erklärung	88

## Abkürzungsverzeichnis

$\alpha$	polarimetrischer Drehwinkel
CLSM	konfokales Laserraster-Mikroskop (Confocal Laser Scanning Microscope)
DPS	Dextranbeprobungslösung (s. Tabelle 1)
ds	diffusible Stoffe
EM	Elektronenmikroskopie
eth	Ethanol
FDA	Fluoresceindiacetat
FM	Feucht- bzw. Frischmasse
FPLC	Fast Protein Liquid-Chromatography
$\gamma_{eth}$	Kontaktwinkel von Ethanol zu Sporopollenin
GPC	Gelpermeationschromatographie
HETP	Trennstufenhöhe (Height Equivalent to a Theoretical Plate)
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
$L_P$	Hydraulische Leitfähigkeit
$L_{PD}$	Ultrafilterkoeffizient
LM	Lichtmikroskopie
$M_r$	Molekülmasse
PE	Polyethylen
PEG	Polyethylenglykol
PI	Propidiumiodid
$\pi$	Osmotischer Druck
REM	Rasterelektronenmikroskopie (engl. SEM)
REV	relatives Elutionsvolumen
RI	Refraktionsindex
$r_s$	Stokes'scher Radius [nm]
RT	Raumtemperatur (20-22°C)
RWC	relativer Wassergehalt (Relative Water Content)
TTC	2,3,5 Triphenyl-Tetrazoliumchlorid
$r_s$	mittlerer Stokes' scher Radius
$\sigma$	Reflexionskoeffizient
TEM	Transmissionselektronenmikroskop
TM	Trockenmasse



## **Vorwort**

Das ist das wundersame Spiel der Kräfte,  
dass sie so dienend durch die Dinge gehen:  
in Wurzeln wachsend, schwindend in die Schäfte  
und in den Wipfeln wie ein Auferstehen.

Rainer Maria Rilke, 1899

## 1 Einleitung

Die Palynologie ist, dem Wortsinn nach, die „Lehre vom ausgestreuten Staub“ und hat rezente und fossile Palynomorphe, einschließlich der Pollen, Sporen, Dinoflagellatenzysten und weitere Mikrofossilien (cf. Acritarche) zum Gegenstand. Der Gebrauch der palynologischen Fachterminologie ist in der Literatur nicht einheitlich und ist der verwendeten Methodik der mikroskopischen Untersuchungen (LM, EM) angepasst (vgl. Abb. 3). Die Terminologie der vorliegenden Arbeit folgt Punt *et al.* [1994]; dazu liegt eine 1999 von P.P. Hoen aktualisierte elektronische Version unter <http://www.bio.uu.nl/~palaeo/glossary/glos-int.htm> vor.

Die Pollenkörner sind die männlichen Gametophyten der Spermatophyta (Samenpflanzen), die Funktionen sowohl der Mikrosporen als auch der Spermien erfüllen. Sie stellen eine eigene Generation, den mehrzelligen haploiden Gametophyten, dar. In der Regel besitzt der Pollen der Samenpflanzen, wie auch die Sporen der Farne, Moose und Bärlappgewächse, sowie die Oocyten der Characeae, eine besondere äußere Hülle (Exine bzw. Sporoderm), welche aus Sporopollenin besteht. Diese Sporopolleninhüllen zeigen eine faszinierende Vielfalt an Strukturdetails und meist ist die Musterung der Oberflächenskulptur sowie die Anordnung der Aperturen (wenn vorhanden) symmetrisch. Die Gestalt, die Lage der Pori bzw. Colpi und die Ultrastruktur der Exinen und Sporodermata bergen einen hohen Informationsgehalt für Paläobotanik und Systematik [Straka, 1975; Blackmore, 1990; Hesse, 1991; Moore *et al.*, 1991]. Die Isolation des Sporopollenins erfolgt gewöhnlich durch Acetolyse, d.h. durch eine Behandlung der Pollen mit Essigsäureanhydrid und konzentrierter Schwefelsäure [Erdtman, 1960]; die ebenfalls äußerst resistenten Algaenane bestimmter Algen (z.B. *Chlorella*) sowie vergleichbare Substanzen bei den Sporenwänden der Flechten, Pilzen, Myxobakterien und verschiedenen fossilen Zellen (Acritarchen), sind dem Sporopollenin in bestimmten Eigenschaften vergleichbar [Brunner, 1985; Talyzina, 1998], jedoch nicht mit ihm identisch [Wiermann *et al.*, 2001].

Erste chemische Analysen der Pollen- und Sporenwände wurden Anfang des 19. Jh. in Berlin von John [1814] durchgeführt. Dieser nannte den „vorwaltenden Bestandteil“ des Tulpenpollen *Pollenin*. In Paris führte Braconnot [1829] diese Arbeiten an *Typha* weiter und bemerkte u.a., dass der Blütenstaub trotz seines hohen Wassergehaltes nicht miteinander verklebt und wie eine Flüssigkeit fließt. Fast 100 Jahre später arbeiteten Zetzsche und seine Kollegen in Bern für mehr als 10 Jahre an der chemischen Analyse des Sporopollenins; anfangs verwendeten sie dazu v.a. *Lycopodium*-Sporen und nannten die gegen chemische Zersetzung resistente Wandkomponente *Sporonin* [Zetzsche und Huggler, 1928]. Aufgrund der Ähnlichkeit des Sporonins der Sporodermata mit dem Pollenin der Exinen (Pollenwände) prägten sie später den Begriff „Sporopollenin“ [Zetzsche und Vicari, 1931]. Elementaranalysen ergaben ein C/H-Verhältnis, ähnlich dem der Terpene, von 1:1,6; zusätzlich ist noch Sauerstoff enthalten, so dass die Summenformel  $(C_{10}H_{16}O_3)_x$  vorgeschlagen wurde. Als dessen Grundbaustein vermuteten sie eine  $C_{90}$ -Einheit, ein polymeres Isopren  $(C_5H_8)_n$ , ähnlich dem Kautschuk, wobei die Formeln in Abhängigkeit der Isolierungsmethode und der Spezies variierten; z.B. für Kiefernpollen  $C_{90}H_{146}O_{27}$  [Zetzsche *et al.*, 1937]. Einer vollständigen Aufklärung der Strukturformel stand die unzureichende Löslichkeit von Sporopollenin entgegen; aus harschen Analysen (Potaschefusion, Ozonolysis) geht es selbst verändert hervor.

Auf einem Internationalen Symposium für Sporopollenin [1971] wurde von Shaw folgende Definition vorgeschlagen: „The remarkable resistance of pollen and spore exines to biological decay and non-oxidative chemical attack is a major contributor to the existence of the science of Palynology. The particular type of chemical material which has these properties, called sporopollenin, has been isolated from a wide variety of pollen grains and spores of both higher and lower plants.“

Heslop-Harrison [1968] u.a. [Brooks und Shaw, 1968] spekulierten, dass Sporopollenin durch oxidative Polymerisation von Carotinoiden und Carotinoidestern entstehe. Diese bis vor kurzem weit verbreitete Annahme [Shaw, 1971] konnte mit  $^{13}C$ -NMR widerlegt werden [Guilford *et al.*, 1988]. Wiermann und Gubatz [1992] zeigten außerdem, dass Tetraterpene nicht an der Biosynthese von Sporopollenin beteiligt sind. Festphasen-NMR in Kombination mit Infrarot-Spektroskopie lieferte erste Anhaltspunkte, dass das Sporopollenin von Moosen, Farnen und Samenpflanzen Aliphate als Hauptbestandteil zusammen mit Aromaten, Ether- und Carbonyl/Carboxyl- Funktionen in unterschiedlichen Anteilen aufweist [Wilmesmeier *et al.*, 1993]. Nachdem deutlich wurde, dass die Acetolyse das Sporopollenin selbst verändert, wurden möglichst milde Reinigungsmethoden eingesetzt und ein geeignetes Lösungsmittel gesucht. Für lange Zeit galt Sporopollenin als völlig unlöslich, bis das vollständige Lösen in heißem 2-Aminoethanol [Bailey, 1960; Southworth, 1974] und auch in Piperidin [Ahlers *et al.*, 1999] gelang, so dass eine Vielzahl von zusätzlichen Analysemethoden möglich wurde (u.a.  $^1H$ -NMR, MALDI-MS). Wurde das Lösungsmittel durch Wasser ersetzt, so konnte spontan die nahezu identische Re-Aggregation von Sporopollenin gezeigt werden [Jungfermann *et al.*, 1997; Thom *et al.*, 1998]. Die wesentlichen Fortschritte der Strukturaufklärung des Sporo-

pollenins wurden von Wiermann und seiner Gruppe geleistet. Danach ist das Sporopollenin der Pollenwände und Sporodermata kein einheitliches Molekül, sondern ein Heteropolymer von verwandten Biomolekülen, das von einfachen aromatischen Monocarbonsäuren wie p-Cumarinsäure (4-Hydroxy-Zimtsäure) und langkettigen, unverzweigten Aliphaten sowie aliphatischen Polyhydroxyl-Komponenten aufgebaut wird; das quervernetzte Molekülgerüst weist Ether-Brücken auf [Wiermann et al., 2001]. Im Sporopollenin von *Pinus* wurden neben ungesättigten Fettsäuren [Hemsley et al., 1993] und n-Alkanen auch Dicarbonsäuren als eine der Hauptkomponenten (29 %) identifiziert [Dominguez et al., 1999]. Tracer-Experimente deuten auf eine Beteiligung des Lipid- und Phenylpropanoid-Metabolismus bei der Biosynthese von Sporopollenin hin [Wiermann und Gubatz, 1992; Gubatz et al., 1993; Wilmesmeier und Wiermann, 1995; Piffanelli et al., 1998; Meuter-Gerhards et al., 1999], jedoch bleibt die genaue Molekülstruktur und ihre Biosynthese im Einzelnen weiter unklar [Wiermann et al., 2001]. Allgemein gilt Sporopollenin als äußerst inert (pH, Säuren, Lösungsmittel), und nur starke Oxidationsmittel können es angreifen. Wird es für Stunden über 200°C erhitzt, so gleicht es fossilem Sporopollenin nach Diagenese, dessen olefinischer Charakter dann leicht durch Oxidation verloren geht, wobei die Struktur zerfällt; im Gegensatz dazu nimmt der aromatische Anteil infolge oxidativer Mazeration (Acetolyse) zu [Hemsley et al., 1996]. Über die Ultrastruktur des Sporopollenins wird seit langem spekuliert [Southworth, 1986; Rowley, 1995; Rowley, 1996]. Die hypothetischen Modelle basieren auf vergleichenden – oft vieldeutigen – REM- und TEM-Aufnahmen verschiedener Stadien der Mikrosporogenese, meist nach partieller Auflösung des Sporopollenins. Die Modelle reichen, von Strukturen aus untereinander verbundenen Körnchen (Abb. 1 a), die um Polygone angeordnet sind [Southworth, 1986], bis zu stäbchenförmigen Elementen von 70 bis 250 nm (mit zunehmendem Reifegrad der Exine größer werdend), sogenannten „Tufts“ [Rowley und Dahl, 1982].

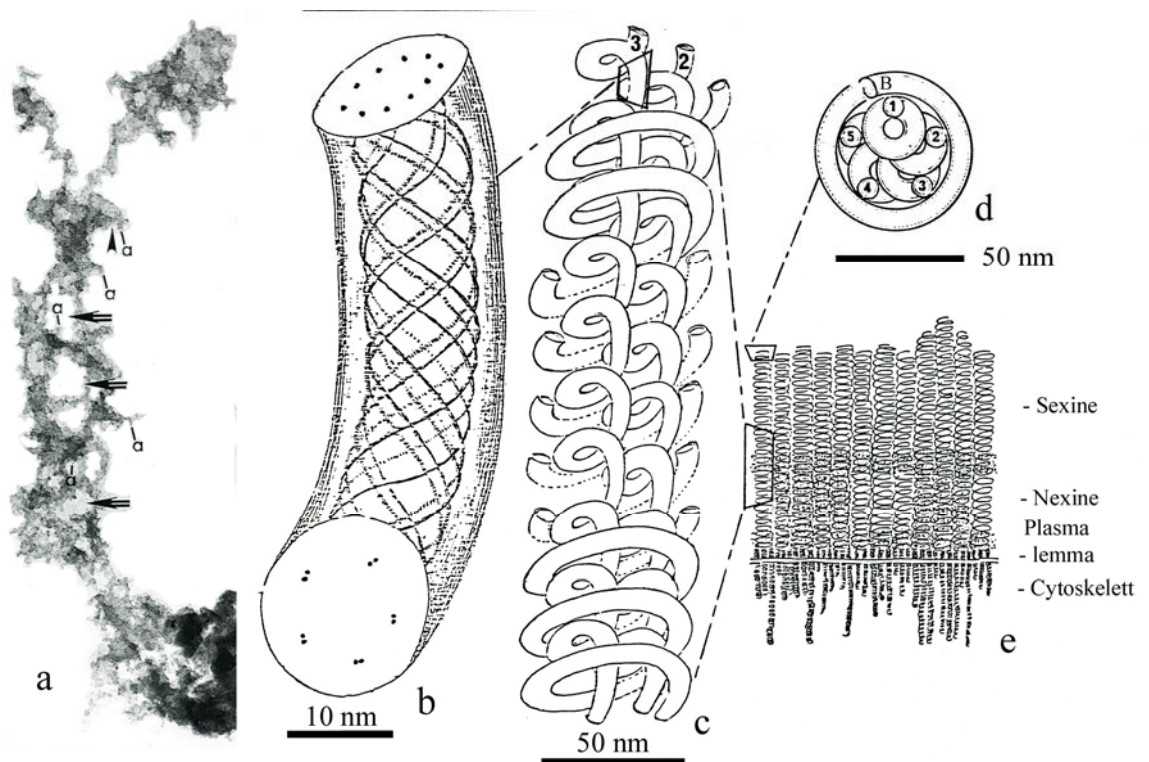


Abb. 1: Elektronenmikroskopisches Bild eines Exinefragments nach Erosion und hypothetisches Modell der Exine. (a) Die Erosion des acetylierten Fragments erfolgte mit 2-Aminoethanol; mit (a) sind abgebrochene Verbindungen (5-10 nm) zu Nachbarsträngen bezeichnet [Southworth, 1986]; (b-e) hypothetisches Modell der Exine, nach Rowley & Flynn [Abadie et al., 1987], (b) röhrenförmige Elemente einer Untereinheit, (c) Seitenansicht einer Exine-Einheit „Tuft“, ca. 70 nm Durchmesser, (d) Sicht auf die Kernzone eines „Tufts“ mit Untereinheiten (1-5) und Verbinderelementen (B), (e) Schema einer juvenilen Exine, nach Polymerisation des Sporopollenins auf der Glykocalyx.

Hier soll nur das sogenannte „Flynn-Rowley-Röhrensystem“ gezeigt werden (Abb. 1). Die Tufts sind spiralförmig aus Unterelementen von 4 bis 10 nm aufgebaut, [Wittborn et al., 1998], deren helixale Anordnung häufig durch amorphes, sekundär akkumuliertes Sporopollenin verdeckt wird

[Rowley, 1996]. Im Nanometerbereich sind diese Strukturen, selbst bei systematisch so weit voneinander entfernten Taxa wie *Lycopodium*, *Pinus* und *Fagus*, sehr ähnlich, im Mikrometerbereich bauen sie aber, vergleichbar mit Lego-Bausteinen, hochdiverse, familien- und gattungsspezifische Exinen bzw. Sporodermata auf.

Die Exine bildet sich am Plasmalemma der Mikrosporen und Pollen im Loculus der Mikrosporophylle, indem die oben genannten Unter-elemente aus dem colloidalen System der loculären Flüssigkeit ausflocken und via „Self-Assembly“ zu einer semi-kristallinen Struktur aggregieren bzw. polymerisieren [Hemsley et al., 1998]. Der offensichtlich hohe Grad genetischer Kontrolle auf die mannigfaltige Musterbildung von Pollen und Sporen wird wahrscheinlich nur zu Beginn des Bildungsprozesses ausgeübt: einerseits durch die als Matrize fungierende Plasmamembran (periphere Membranproteine ?) und andererseits durch Kontrolle der Startbedingungen (Flockungsmittel, UV-Strahlung, Enzyme) im äußeren colloidalen System [Dickinson und Sheldon, 1986].

Das Biomakromolekül Sporopollenin, welches extrem resistent gegen Zersetzung und Chemikalien ist, hat in der Evolution wahrscheinlich eine entscheidende Rolle bei dem Übergang von aquatischer zu terrestrischer Lebensweise gespielt. Die Gameten der Charophyten, die durch Wasser verbreitet werden, sind nicht auf diese Weise geschützt, wohl aber die zygotischen Oosporen einiger Vertreter (z.B. *Chara*, *Coleochaete*) dieses Taxons [Delwiche et al., 1989]. Diese sind mit Sporopollenin umhüllt und widerstehen so der mikrobiellen Zersetzung. Das Sporopollenin erlaubt, ihren Transport durch die Atmosphäre von einem feuchten Milieu zum anderen zu überleben; dabei bietet es Schutz vor UV-B-Strahlung [Rozema et al., 2001]. Einer weit verbreiteten Ansicht zufolge sollen Pollenwände hydrophob sein [Tomlinson, 2000] und ihren Zellinhalt vor Austrocknung schützen [Heslop-Harrison, 1973; Raven, J.A., 2000], vgl. ([Raven, P.H. et al., 2000], S. 433f). Diese Annahme scheint vordergründig plausibel, in Anbetracht der weitgehenden Reduktion der Exine vieler monokotylar Seegräser, welche submers bestäubt werden [Ducker et al., 1978]. Das Vorkommen von hydrophobem Pollenkitt ist jedoch auf angiosperme Pollen beschränkt [Knoll, 1930; Hesse, 1981]. Außerdem dürften die Exinen aperturater Pollenkörner kaum eine Wassertransportbarriere darstellen. Die Pollenarten vieler Angiospermen und aller Gymnospermen weisen zum Zeitpunkt ihrer Verbreitung einen niedrigen Wassergehalt auf und können auf der Narbe bzw. in der Mikropyle rasch wieder befeuchtet werden [Linskens, 1964], so dass die Funktionen von Exine und Cuticula verschieden sein sollten.

Jedoch wurden Fragen nach der physiologischen Funktion des Sporopollenins bei der Verbreitung, der Bestäubung und der Pollenquellung aufgrund des Fehlens von Daten über physiko-chemische Eigenschaften bisher bloß spekulativ behandelt. Ihre experimentelle Prüfung erfordert die Untersuchung der isolierten Exine. So sollen in dieser Arbeit u.a. die Benetzbarkeit von Sporopollenin mit verschiedenen Flüssigkeiten, das Porenvolumen und die damit zusammenhängende Durchlässigkeit der Exine für Wasser (hydraulische Leitfähigkeit) und Lösungen (Permeabilitätskoeffizienten) untersucht werden. Neben der Erforschung der physiologischen Bedeutung des Sporopollenins weckte seine außergewöhnliche Stabilität in organischen und wässrigen Lösungsmitteln sowie in den meisten chemischen Reagenzien unser Interesse für mögliche biotechnologische Anwendungen der Sporopolleninkapseln. Bisher wurde Sporopollenin, gewonnen aus *Lycopodium*-Sporen, lediglich als Ionen- und Ligandaustauschmaterial eingesetzt und für diesen Zweck u.a. durch Aminoethyl-, Carboxyl- u.a. Gruppen modifiziert [Ersoz et al., 1995; Vural et al., 1995; Cengeloglu et al., 1998]. Hier sollen die Möglichkeiten untersucht werden, Sporopolleninkapseln in der Permeations- und Ausschlusschromatographie einzusetzen. Die in der Arbeitsgruppe Zellbiologie etablierten Methoden [Ehwald et al., 1989; Jäschke et al., 1991; Kleine et al., 1992; Woehlecke und Ehwald, 1995] zur kinetischen Charakterisierung von Zellwandkapseln und künstlichen Membranen sollen hierfür genutzt werden. Die Fragestellung nach der Permeabilität des Sporopollenins beschränkte die Wahl des Untersuchungsobjekts auf inaperturaten Pollen. Es kam die Idee auf, die Membraneigenschaften der kontinuierlichen Sporopolleninkapseln mit Hilfe der oben erwähnten permeations-chromatographischen Methoden zu charakterisieren.

Geeigneter Pollen musste problemlos in großer Menge in der näheren Umgebung zu sammeln sein. Windbestäubte Bäume wie *Alnus*, *Corylus* und *Betula* und *Pinus* bilden Pollen in sehr großer Menge. Die Kiefer besitzt eine kontinuierliche Exine (Abb. 2) und nur eine geringe Menge an sogenannten epicuticulären Wachsen [Niester et al., 1987; Wiermann und Gubatz, 1992]. Die Untersuchung der Barrierefunktion des Sporopollenins ist daher in Kiefernpollen besonders leicht zugänglich. Für die Auswahl der Kiefer sprach auch, dass die Allergenität ihres Pollens als vergleichsweise niedrig eingestuft wird [Harris und German, 1985; Marcos et al., 2001; Gastaminza Lasarte, 2003]. Kiefernpollen kommt konzentriert, innerhalb von zwei Wochen, (Tonnen pro Hektar), in solchen Mengen vor (sogenannter „Schwefelregen“), dass er eine besondere Corona während des Sonnenuntergangs hervorruft [Schneider und Vollmer, 2005].

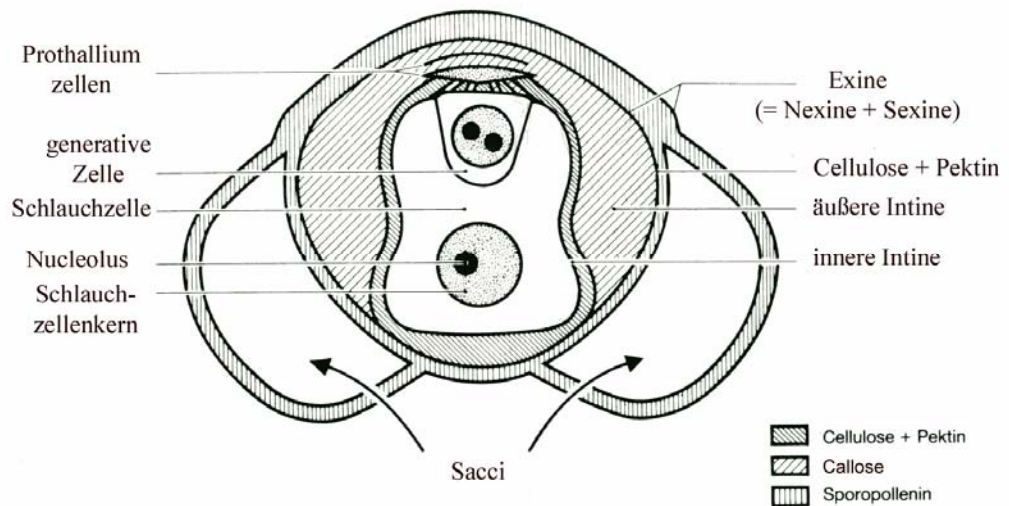


Abb. 2: Aufbau des reifen Kiefernpollens. Die Wandstrukturen (Exine, innere und äußere Intine) sowie Calloseablagerungen sind unterschiedlich schraffiert (Pinus sylvestris, nach Martens & Waterkeyn, 1962 in [Stanley und Linskens, 1985] S. 152).

Das reife Pollenkorn der Kiefer enthält den männlichen, noch unreifen, 4-zelligen Gametophyten. Dieser wird von mehreren Zellwänden, der inneren und der äußeren Intine, umgeben. Die äußere Intine enthält neben Cellulose und Pektin vor allem Callose. Der Sporoplast besteht aus zwei (vegetativen) Prothalliumzellen, einer generativen Zelle und einer siphonogenen Zelle (Pollen-schlauchzelle). Der weitere Entwicklungsverlauf des Gametophyten, welcher zum Zeitpunkt der Bestäubung noch nicht geschlechtsreif ist, wird weiter unten beschrieben.

Aus dem bisaccaten Pollen der Kiefer lassen sich einheitlich große (= monodisperse) drei-kammrige Mikrokapseln präparieren (s. Material & Methoden 3.2). Die mehrschichtigen Exinekapseln der Kiefernpollen lassen sich morphologisch in eine Zentralkapsel (Corpus), die den Gametophyten umschließt, und in zwei laterale Luftsäcke (Sacci) unterscheiden. Wie in Abb. 3 schematisch illustriert, sind an den Sacci die äußeren Strata der Ectexine von den inneren zwei Exineschichten (Endexine und Fußschicht) abgehoben.

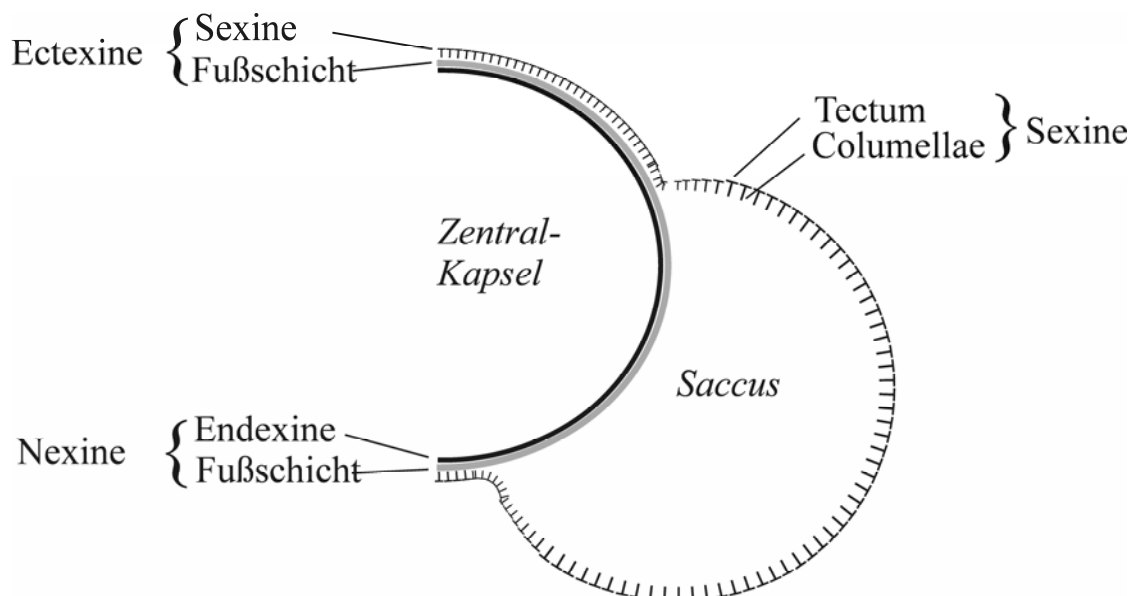


Abb. 3: Schematischer Aufbau der Kieferexine. Die äußeren Sporopollenin-Strata der Ectexine (Sexine) sind von der Fußschicht abgelöst und formen so die Sacci. Die Zentralkapsel entspricht dem Corpus nach erfolgter Präparation.

Die äußere Membran der Sacci ist aus vielen Stäbchen (Columellae) aufgebaut, die nach außen hin zu einem Tectum verschmolzen sind und zusammen als Sexine bezeichnet werden. Die voneinander abweichenden Terminologien Ectexine/Endexine [Erdtman, 1952] und Sexine/Nexine [Skvarla und Larson, 1966] leiten sich von der Art der Untersuchung, mittels Lichtmikroskopie bzw. Elektronenmikroskopie, ab.

Vor dem Hintergrund anemophiler Verbreitung betrachtet, verringern die Luftsäcke die spezifische Dichte saccater Pollenkörner einerseits und andererseits vergrößern sie die Angriffsfläche für den Wind. Diese Eigenschaften sind wichtig für das Erreichen der weiblichen Strobili [Niklas, 1992]. Diese sind viel größer, ausdauernder und in ihrer Struktur komplizierter als die männlichen Sporophyllstände. Die Epidermis der sterilen Deck- und Samenschuppen, die an ihrer Basis zwei Samenanlagen trägt, ist mit epicuticulären Wachsen überzogen und daher mit Wasser nicht benetzbar; auftreffender Pollen wird leicht wieder durch Wassertropfen aufgenommen und kann so in die Mikropyle gelangen. Jede Samenanlage besteht aus einem vielzelligen Nucellus (Megasporangium), welcher von einem kräftigen Integument mit einer Öffnung (Mikropyle) umgeben ist. Jedes Megasporangium enthält nur eine Megasporenmutterzelle, aus der schließlich (etwa einen Monat nach der Bestäubung) unter Meiose vier Megasporen entstehen von denen nur diejenige, die am weitesten von der Mikropyle entfernt liegt, überlebt.

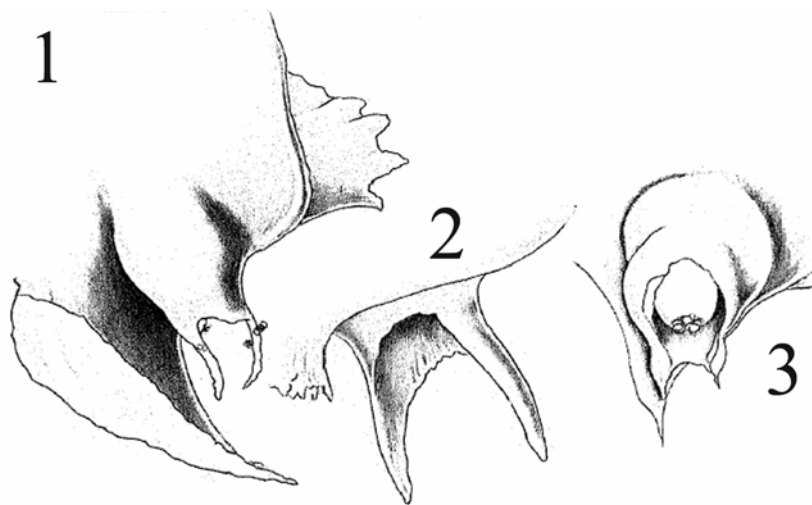


Abb. 4: Anhaftende Kiefernpollen an der Mikropyle. (1) Adaxiale Sicht auf die Samenanlage mit Teilen der Deck- und Samenschuppen. (2) Abaxiale Sicht auf die Mikropyle derselben Samenanlage. (3) Freigelegte Samenanlage mit Pollenkörnern in der Vertiefung des Nucellus. Abbildung, verkleinert, entnommen aus [Doyle und O'Leary, 1935].

Die Spitze des Integuments teilt sich in zwei Mikropylararme, welche nicht mit epicuticulärem Wachs bedeckt sind, so dass deren Oberfläche gut mit Wasser benetzbar ist. Die Arme haben zu dieser Zeit ein dichtes Cytoplasma und bilden ein Drüsengewebe mit zahlreichen feinen Papillae, welches viele lipidhaltige Mikrotröpfchen ausscheidet. An diesem haftet auftreffender Pollen sehr fest (Abb. 4). Die Mikropylararme geben nach der Anheftung der Pollenkörner nochmals lipidhaltige Tröpfchen ab [Owens et al., 2001]. Der Nucellus sekretiert einen großen, wässrigen Bestäubungstropfen, der bis vor die Mikropylararme reichen kann [Owens et al., 1998]. Darin steigt das lufthaltige saccate Pollenkorn (vgl. 5.1.2.2) in der invertierten Samenanlage nach oben [Doyle und O'Leary, 1935]; außerdem verdunsten die Bestäubungstropfen Wasser und ziehen so die Pollenkörner in den Mikropylarkanal bis zum Nucellus. Dort beginnt nach ein bis zwei Tagen der Pollenschlauch auszukeimen. Nach erfolgter Bestäubung dienen die Sacci sowohl dem Auftrieb des Pollenkorns in dem Bestäubungstropfen, welcher in der inversen Mikropyle der Samenanlage hängt (Abb. 4), als auch der Orientierung des Korns, so dass der Pollenschlauch nach oben, durch den Nucellus wachsen kann [Owens et al., 1998; Owens et al., 2001; Salter et al., 2002]. Das Wachstum des Pollenschlauchs erfolgt bei *Pinus* äußerst langsam. Wenn er beginnt den Nucellus zu durchwachsen, ist die Samenanlage noch nicht geschlechtsreif. Der weibliche Gametophyt entwickelt sich weiter bis zur Befruchtung, welche im Sommer des darauf folgenden Jahres erfolgt. Zwölf Monate vor der Befruchtung teilt sich die generative Zelle in eine sterile Stielzelle und eine spermatogene Zelle und der reife, männlichen Gametophyten wird 5-zellig. Ungefähr 15 Monate nach der Bestäubung erreicht der Pollenschlauch die Eizelle eines Archegoniums, wo er einen großen Anteil seines Cytoplasmas und seine beiden Spermakerne ins Cytoplasma der Eizelle



entleert. Ein Spermakern verschmilzt mit dem Eikern und der andere geht zugrunde (weitere Informationen zur Entwicklungsbiologie [Raven, P.H. et al., 2000], S. 505ff u. 534ff).

Der Reproduktionszyklus der monözischen Kiefer dauert oft zwei und mehr Jahre und ist bei vielen *Pinus*-Arten (z.B. bei *P. sylvestris*) durch eine Dormanzperiode unterbrochen [Pacini et al., 1999]. Die Entwicklung der Mikrosporen (einkernige Pollenkörner) und die anschließende Mikrogametogenese zum mehrzelligen Pollenkorn erfolgt in zapfenförmigen 1-2 cm langen Mikrosporophyllenständen (Strobili), welche auf den tieferen Zweigen auf demselben Baum wie die weiblichen Zapfen stehen. Jeder Strobilus trägt viele, spiralförmig um die Sprossachse angeordnete, dünnhäutige Mikrosporophylle, von denen jedes auf der Unterseite zwei Mikrosporangien aufweist, deren innerste Zellschicht (Tapetum) zahlreiche Mikrosporenmutterzellen umgibt ([Raven, P.H. et al., 2000], S. 505ff). Das Tapetum bei *Pinus* stellt eine Übergangsform (parietales Tapetum [Pacini et al., 1999]) zwischen einem wandständigen, sekretorischen Tapetum (evolutionär ursprünglich, v.a. in trockenen Habitaten) und einem invasiv-amöboiden Tapetum dar, dessen innere Primärwände kurz vor der Tetradenbildung (Meiose der Mikrosporenmutterzellen) aufgelöst werden und die Tetrade im Loculus umfließt. So wird eine effizientere Ernährung sowie die Abgabe von Exocytosevesikeln ermöglicht [Wallace und Rowley, 1982; Pacini et al., 1985; Rowley et al., 1992]. Die Bildung der Exine beginnt vor der ersten Mitose, währenddessen die Mikrosporen noch im Tetradenstadium in Callose eingehüllt vorliegen. Die Exine wird auf bzw. innerhalb von callosehaltigen Zellwänden gebildet, die sich noch in der Entwicklung befinden. Die Polymerisation erfolgt oft nur im Abstand von 10 nm zur Plasmamembran.

Sporopollenin ist hinsichtlich Zusammensetzung und beteiligter Vorstufen mit Suberin verwandt; vgl. [Bernards, 2002]. Die Fähigkeit der Embryophyta, beide Polymere zu synthetisieren, könnte einen gemeinsamen Ursprung haben [Kroken et al., 1996]. Die Exine wird, wie Suberin und Lignin, zunächst als Lamelle zwischen wachsenden Zellwandschichten gebildet (inkrustiert). Sie ist, ähnlich wie der Casparysche Streifen in der Endodermis, nicht in die Sekundärwand inkrustiert, sondern liegt ihr außen auf. Die Exine bildet später den äußeren Zellabschluss. Dies ist aber erst dann der Fall, wenn die älteste, ursprünglich außen liegende, callosereiche Zellwandschicht, welche die Tetrade während der Exinebildung umgibt, aufgelöst wird. Im reifen Pollenkorn umhüllt die nahezu kohlenhydratfreie Exine die aus Polysacchariden bestehende Zellwand (Intine), vgl. Abb. 2.

Bei der Exinebildung wird bei den Kiefernpollen zuerst die Ectexine mit ihrer typischen Oberflächenskulptur und ihre Ausdehnung an Luftsäcken beobachtet. Danach entstehen die Lamellen der Endexine. Neben der sporophytischen Herkunft der Sporopollenin- Precursoren der Ectexine (aus dem Tapetum) wird auch eine, zumindest anteilige, gametophytische Herkunft der Endexine diskutiert [Rowley et al., 2000a]. Während die Sacci weiter expandieren, löst sich die Callosehülle auf und die Dicke der Exine nimmt zu [Rowley et al., 1999]. Etwa zwei Wochen bevor der Pollen ausgeschüttet wird, bildet sich die äußere Intine (s. Abb. 2) unter der Endexine [Rowley et al., 2000b]. Dies leitet die Mikrogametogenese ein. Nach zwei Mitosen und der „Wanderung“ der ersten Prothalliumzelle zur proximalen Wand bildet sich die innere Intine. Der Pollen der Kiefer ist zum Zeitpunkt der Ausstäubung kaum vakuolisiert und seine Atmung ist extrem reduziert [Linskens, 1964]. Ist eine bestimmte Temperatur und Entfeuchtung erreicht, reißen die Sporangien kohäsiv auf und eine massenhafte Freisetzung der reifen Pollenkörner beginnt [Khanduri und Sharma, 2000]. Im Berliner Raum erfolgt dies in der Regel Mitte bis Ende Mai.

## 2 Aufgabenstellung

Die Zielvorstellung des Promotionsvorhabens bestand darin, die physikalischen und physiko-chemischen Eigenschaften gereinigter Exinen der Kiefer zu charakterisieren und so Beiträge einerseits zur Aufklärung der physiologischen Bedeutung des Sporopollenins und andererseits für eine mögliche biotechnologische Anwendung der Sporopolleninkapseln zu leisten. Pollen ohne Poren oder Colpen eignet sich für die Untersuchung der Permeabilität der Exine. Von der anemophilen Waldkiefer (*Pinus sylvestris* L.) lassen sich in Berlin/Brandenburg leicht größere Mengen sammeln.

Ein Schwerpunktproblem dieser Arbeit ist die bereits angesprochene Frage nach der Barrierefunktion der Exine. Bietet sie Pollenkörnern einen wirksamen Verdunstungsschutz? Wie stark behindert sie den Transfer von flüssigem Wasser, gelösten niedermolekularen Stoffen (Ionen, Zuckern) und von Polymeren?

Ein weiteres Schwerpunktproblem besteht in der Charakterisierung der Benetzbarkeit und Quellbarkeit der Kiefernexine mit Wasser sowie mit amphiphilen und hydrophoben organischen Flüssigkeiten. Beides, die Barrierefunktion als auch die adhäsiven und absorptiven Eigenschaften sind sowohl für die physiologische Funktion der Exine als auch für eine mögliche Nutzung gereinigter Sporopolleninkapseln (Chromatographie, Immobilisierung etc.) von großer Bedeutung. Da praxisbezogene biotechnologische Aufgaben (Suche nach attraktiven Anwendungen der Permeationschromatographie mit Sporopolleninkapseln) von anderen Kollegen in der Arbeitsgruppe untersucht wurden, sollten die chromatographischen Untersuchungen ausschließlich der Charakterisierung der Barrierefunktion der Kiefernexine dienen. Hinsichtlich des physiologischen Aspektes sollte sich die Arbeit allerdings nicht auf die Untersuchung der gereinigten Exinen beschränken, sondern auf das intakte physiologische System des Pollens ausgedehnt werden. Nur so lassen sich Hypothesen zur Funktion der Exine, die aus den an der isolierten Exine gewonnen Befunden abgeleitet werden können, auch prüfen.

Davon ausgehend ergaben sich u.a. folgende Aufgaben:

- Der Zeitverlauf des diffusionsbedingten Stoffaustausches zwischen den unterschiedlichen Kompartimenten einer Sporopolleninkapsel der Kiefer (Luftsäcke, Zentralkapsel) und dem wässrigen Milieu sollte für niedermolekulare Stoffe (Alkohole, Zucker, Salze) und für Kolloide (Dextrane, Proteine, Nanopartikel) untersucht werden. Hierzu sollten bereits vorhandene methodische Ansätze (kontinuierliche Messung der Abgabe gelöster Stoffe und des Wassers aus vorgesättigten Kapseln mit einem registrierenden Polarimeter [Ehwald et al., 1973a; Ehwald et al., 1973b; Fleischer und Ehwald, 1995], chromatographische Permeabilitätsbestimmung auf der Grundlage der kinetisch bedingten Peakverbreiterung [Ehwald et al., 2002a; Woehlecke et al., 2002], chromatographische Permeabilitätsanalyse auf der Grundlage der Dispersitätsänderung des Permeates [Woehlecke und Ehwald, 1995; Dautzenberg et al., 1999] an das Untersuchungsmaterial angepasst und weiterentwickelt werden.
- Die osmotischen Besonderheiten (Reflexionskoeffizient, Dehnungsfestigkeit der Pollenkörner und Sporopolleninkapseln) sollten charakterisiert werden, auch um die Möglichkeit zu erkunden, einerseits die Exine der Zentralkapsel in denaturiertem Pollen oder in gereinigten Sporopolleninkapseln auf osmotischem Wege künstlich aufzureißen oder andererseits die Zentralkapsel zum Schrumpfen zu bringen.
- Das Verhältnis von Poren- und Feststoffvolumen in der Sporopolleninmatrix sollte bestimmt werden.
- Die Benetzbarkeit und das Quellungsverhalten des Sporopollenins in hydrophilen, amphiphilen und hydrophoben Flüssigkeiten sollte untersucht werden.
- Der Gehalt der Exine an titrierbaren funktionellen Gruppen sollte bestimmt werden.
- Das Quellungsverhalten (Form- und Volumenänderungen) lebender Pollenkörner sollte unter den Aspekten der Harmomegathie und der an den isolierten Exinen ermittelten hydraulischen Leitfähigkeit untersucht werden.



### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Geräte und Chemikalien

##### 3.1.1 Geräte

Folgende Geräte und Mikroskope wurden eingesetzt: Analysewaage (Sartorius AG, Göttingen, Deutschland), Gefriertrockenanlage Alpha 1-4 (Christ, Osterode/Harz, Deutschland), Kryoskop (Knauer GmbH, Berlin, Deutschland), Partikel-Sizer (Analysette A22, Fritsch GmbH, Idar-Oberstein, Deutschland), Polarimeter von Perkin & Elmer 141 M (Überlingen, Deutschland), Ultraschallstab (Sonoplus HD200, Bandelin Elektronik GmbH&Co KG, Berlin, Deutschland) mit Sonotrode (TT 13, Ø 12,7 mm), Drucksensor (AktivSensor GmbH, Stahnsdorf, Deutschland), Digital-pH-Messgerät (MV 870, VEB Vacutronic Dresden, Deutschland) mit einer pH-Einstab-Elektrode (InLab 410 pH-Einstabmesskette, Mettlers Toledo, Steinbach, Deutschland), HPLC-Anlage (VP-Series, Shimadzu Deutschland GmbH, Duisburg, Deutschland), Chiralysen (IBZ Messtechnik, Hannover, Deutschland), RI-Detektor (ERC7512, Erma CR Inc., Tokyo, Japan), Superdex-Säule (75-HR, Pharmacia, Uppsala, Schweden), Leersäulen HR10/30 (30 X 1 cm) und HR16/5 (5 X 1,6 cm) der Firma Amersham Biosciences AB (Uppsala, Schweden), Rasterelektronenmikroskop (Leica S360, Cambridge, UK), Konfokale Laserraster-Mikroskope von Leica CLSM (Leica Laser-Technik GmbH, Heidelberg, Deutschland) und LSM 510 META (Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland) kombiniert mit einem Axiovert 200 M Mikroskop von Zeiss.

##### 3.1.2 Chemikalien

Die folgenden Farbstoffe wurden verwendet: Evans Blau ( $M_r = 960,8 \text{ g mol}^{-1}$ ; Reanal, Budapest, Ungarn), Calcofluor® White ( $M_r = 917,0 \text{ g mol}^{-1}$ ; American Cyanamid Company, Bound Brook, NJ, USA), 5-(6)-Carboxyfluorescein ( $M_r = 376,3 \text{ g mol}^{-1}$ ; Molecular Probes Inc., Eugene, OR, USA), FITC-(Fluorescein-Isothiocyanat)-markiertes Rinder Serum Albumin (BSA,  $69 \text{ kg mol}^{-1}$ ; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland), FITC (Fluorescein-Isothiocyanat)-Dextran (FD-250S,  $M_r = 282 \text{ kg mol}^{-1}$ ; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim), Fluoresceindiacetat (FDA, 5-Carboxy-fluorescein Diacetat N-Succinimidyl Ester,  $M_r = 557,46 \text{ g mol}^{-1}$ ; Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz), Propidium-Iodid (PI,  $M_r = 668,4 \text{ g mol}^{-1}$ ,  $\lambda_{\text{Exit}} = 493 \text{ nm}$ ; Sigma, Deisenhofen, Deutschland), 2,3,5 Triphenyltetrazoliumchlorid (TTC,  $M_r = 334,8 \text{ g mol}^{-1}$ ; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland).

Kolloide und Nanopartikel zur Untersuchung der Barrierefunktion wurden von folgenden Herstellern bezogen: Natrium-Polyacrylat 2100 (PA,  $M_r = 2100 \text{ g mol}^{-1}$ ; Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz), Human Serum Albumin (HSA,  $69 \text{ kg mol}^{-1}$ ,  $r_s = 35 \text{ nm}$ ; Germed, Institut für Impfstoffe, Dessau, Deutschland), Immunglobulin (IGG,  $900 \text{ kg mol}^{-1}$ ; Serva, Heidelberg, Deutschland), Dextran T70 ( $M_r = 70 \text{ kg mol}^{-1}$ ; Pharmacia, Uppsala, Schweden), Dextran T2000 ( $M_r = 2000 \text{ kg mol}^{-1}$ ; Serva, Heidelberg), Dextran T5000 ( $M_r = 5000 \text{ kg mol}^{-1}$ ; Serva, Heidelberg), FITC-markierte Latexpartikel (Fluoresbrite Plain YG 0.2 micron microspheres,  $\varnothing = 0,217 \pm 0,015 \mu\text{m}$ , 2,5 % Latexfeststoff; Polyscience Europe GmbH, Eppelheim, Deutschland), FITC-markierte Latexpartikel (Fluoresbrite Plain YG 1.0 micron microspheres,  $\varnothing = 1,0 \mu\text{m}$ ; Polyscience Europe GmbH, Eppelheim).

Die Komponenten der Dextranbeprobungslösung (DPS) sind in Tabelle 1 angegeben.

Sonstige Chemikalien und Enzyme: Phosphatpuffer (0,01 M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 0,1 M NaCl, 0,1%  $\text{NaNO}_3$ , pH 7,0), Cäsiumsulfat ( $M_r = 361,87 \text{ g mol}^{-1}$ ,  $\rho = 1,864 \text{ kg L}^{-1}$  bei  $T = 20^\circ\text{C}$ ; Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz),  $\alpha$ -Methylglucosid ( $M_r = 194 \text{ g mol}^{-1}$ ; Sigma, St Louis, MO, USA), Raffinose ( $M_r = 594,52 \text{ g mol}^{-1}$ ; Difco Laboratories, Detroit, MI, USA), Siliconöl AS4 ( $\rho < 1 \text{ kg L}^{-1}$ ; geringe Viskosität; Wacker-Chemie GmbH, Burghausen, Deutschland), cyclisches Siliconöl AP100 ( $\rho = 1,026 \text{ kg L}^{-1}$ ; Wacker-Chemie GmbH, Burghausen), Cellulase ("Onozuka R10", Boehringer Ingelheim Bioproducts, Heidelberg, Deutschland), Macerozyme (R10, Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg), Rinderpankreasenzymzubereitung "Trypsin zur Zellzucht" (Bernd Belger, Klein-Machnow, Deutschland), Invertase und Glucose-Oxidase (Sigma Diagnostics, St. Louis, MO, USA).

#### 3.2 Pollen und Sporopolleninkapseln

##### 3.2.1 Ernte

Kiefernpollen wurde jährlich, 2002 bis 2005, Mitte bis Ende Mai in der näheren Umgebung von Berlin (*Pinus sylvestris* L.) bzw. in der Umgebung von Belzig (*Pinus nigra* ARNOLD), Brandenburg, ge-

erntet. Reife, männliche Sporophyllstände wurden in Weithalsflaschen oder Plastikbeuteln ausgestäubt. Unreife Sporophylle wurden bei Raumtemperatur auf glattem Papier ausgelegt um den Pollen zu ernten. Unter Ausnutzung ihrer Masse wurden die Pollenkörner von Sporophyllen, Deckschuppen, Insekten (v.a. Jugendstadien von Thysanopteren) und Staub durch Rütteln und anschließendem Sieben ( $\varnothing$  63  $\mu$ m) getrennt und gereinigt. Die Lagerung erfolgte bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  ( $= 253\text{ K}$ ),  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  oder RT.

### 3.2.2 Sporopolleninkapseln

Reifer Kiefernpollen wurde denaturiert und die Protoplasten entfernt. Die hier verwendete Methode basiert auf früheren Protokollen zur schonenden Deproteinierung sowie für die Isolation von Exinen [Ehwald et al., 1992; Wiermann und Gubatz, 1992]. Die Pollenkörner wurden in phosphorsaurem 60 %igem (v/v) Ethanol ( $10\text{ mL L}^{-1}$  Phosphorsäure) denaturiert. Dann wurden Lipide und Fette so lange abwechselnd in heißem 96 %igem Ethanol ( $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) und Dioxan ( $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) extrahiert, bis das Extrakt beim Mischen mit Wasser klar blieb und die entfetteten Pollen wurden mit 50 % Ethanol und anschließend mit Wasser gewaschen. Darauf wurden die Zellwand- und Protoplastenbestandteile in der Pollenmasse einer sauren Hydrolyse unterzogen. Dazu wurde die Pollenmasse in einem dicht verschlossen Gefäß in einer anoxischen Lösung, die  $30\text{ g L}^{-1}$  Schwefelsäure und  $2\text{ g L}^{-1}$  Natriumsulfit enthielt, für 72 h bei  $90\text{ }^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Nach dem Abkühlen wurden die Partikel auf einer Glasfritte (S3) mit Wasser gewaschen und in einer basischen Lösung ( $10\text{ g L}^{-1}$  Natriumcarbonat,  $5\text{ g L}^{-1}$  Natriumdithionit,  $1\text{ g L}^{-1}$  Natriumdodecylsulfat) bei Raumtemperatur für 24 h neutralisiert und mit Wasser gewaschen. Anschließend wurden die Partikel auf der Glasfritte mit dem dreifachen Packungsvolumen einer Natriumchlorid-Lösung ( $5\text{ g L}^{-1}$ ) und zuletzt mit Wasser gewaschen. Die erhaltenen Sporopolleninkapseln wurden in 50 % Ethanol aufbewahrt.

### 3.2.3 Größenmessung der Zentralkapsel

Morphometrische Untersuchungen der Zentralkapsel wurden mit Hilfe einer Schieblehre an stark vergrößerten, digitalen, lichtmikroskopischen Bildern der in Wasser gequellten Sporopolleninkapseln (dichte Suspension) unter Verwendung eines Objekt-Mikrometers ausgeführt. Die zwei kurzen Durchmesser (b, c) der annähernd ellipsoiden Zentralkapsel wurden entweder von Aufsichten (b) oder Seitenansichten (c) erhalten (s. Abb. 6); der lange Durchmesser (a) konnte aus beiden Ansichten erhalten werden.

### 3.2.4 Fragmentierung präparierter Exinen

Ein Gramm trockener Sporopolleninkapseln (s. 3.2) wurde zusammen mit 4 g kristallinem Natriumchlorid in 15 mL 96 %igem Ethanol suspendiert und für 20 min in einem gekühlten Zentrifugenglas (50 mL) mit Ultraschall (Sonoplus HD200) behandelt. Dabei hatte die Sonotrode (TT 13,  $\varnothing$  12,7 mm) einen direkten Kontakt zu der Suspension, so dass die maximale Leistung von 120 Watt (50 % Intervallmodus) zur Wirkung kam. Das vollständige Aufbrechen der Zentralkapseln wurde mikroskopisch kontrolliert; intakte Zentralkapseln schlossen Evans Blau ( $10\text{ g L}^{-1}$ ) aus. Die erhaltenen Exinefragmente wurden, um das Salz zu entfernen, auf einer S4-Glasfritte mit 50 %igem Ethanol gewaschen. Nachfolgend wurden Überreste der Intine und des Protoplasten mit Pankreasenzymlyse und cellolytischen Enzymen entfernt. Für die enzymatische Hydrolyse wurden die Fragmente in einen 0,1 M Natriumazetatpuffer pH 4,5 mit  $10\text{ g L}^{-1}$  Cellulase und  $10\text{ g L}^{-1}$  Macerolyse für drei Tage bei  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  inkubiert und daraufhin für zwei Tage in einem 0,01 M Natriumphosphatpuffer pH 6,5 mit  $0,2\text{ g L}^{-1}$   $\text{CaCl}_2$ ,  $10\text{ g L}^{-1}$  NaCl,  $0,5\text{ g L}^{-1}$   $\text{NaN}_3$ , und  $2\text{ g L}^{-1}$  Rinderpankreasenzymzubereitung "Trypsin zur Zellzucht" bei  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Die Partikel wurden in einer Lösung von  $10\text{ g L}^{-1}$  Natriumcarbonat,  $5\text{ g L}^{-1}$  Natriumdithionit und  $1\text{ g L}^{-1}$  Natriumdodecylsulfat bei Raumtemperatur für 24 h inkubiert und mit dem dreifachen Packungsvolumen einer Natriumchlorid-Lösung ( $5\text{ g L}^{-1}$ ) und zuletzt mit Wasser auf der Glasfritte gewaschen, bis das Extrakt frei von UV-absorbierenden Substanzen (280 nm) war. Nach wiederholtem Waschen und Zentrifugieren wurden die Fragmente in der Gefriertrockenanlage Alpha 1-4 getrocknet.

### 3.2.5 Osmotisch induziertes Sprengen der Zentralkapsel

Zu einer wässrigen Suspension (50 mL) von Pollenkörnern oder Sporopolleninkapseln (s. 3.2) wurde langsam ( $0,1\text{ mL min}^{-1}$ ) kalte Elektrolytlösung oder Phosphorsäure mit einer Spritzenpumpe zugeführt. Dabei wurden, um ein Schrumpfen der Zentralkapseln zu vermeiden, zuerst verdünnte

Elektrolytlösungen zugegeben, dekantiert und nachfolgend langsam konzentrierte Lösung bis nahe an die Sättigungskonzentration 7,1 M (Natriumhydrogenphosphat) bzw. 85 Gewichtsprozent (Phosphorsäure) zugegeben, so dass die Geschwindigkeit der Konzentrationszunahme niemals größer war als 5 mM pro Minute. Anschließend wurde die Suspension unter ständigem Rühren in einen großen Überschuss heißen Wassers (ca. 90 °C) überführt.

### 3.2.6 Füllen der Sacci mit Siliconöl

Für die gleichmäßige Benetzung der Pollen in der Durchflussspolarimetrie (s. 3.3) wurden für jede Probe 150 mg lufttrockene Kiefernpollenkörner in 400 µL Siliconöl AS4 ( $\rho < 1 \text{ kg L}^{-1}$ ) so lange geschüttelt, bis die Sacci keine eingeschlossene Luft mehr enthielten. Für die Bestimmung der zeitabhängigen Wasserabsorption (3.13) wurde eine geringe Menge Kiefernpollen (1-2 mg) in 100 µL Siliconöl AP100 mit einer Dichte von  $1,026 \text{ kg L}^{-1}$  gevortext. Dabei wurde darauf geachtet, dass alle Körner sedimentierten indem sich deren Sacci mit dem Öl füllten. Für die CLS-Mikroskopie (3.12) wurden die Sacci (der Pollenkörner oder Kapseln), je nach der gewünschter Orientierung auf dem Objektträger, mit Siliconölen unterschiedlicher Dichte (AP100 oder AS4) gefüllt.

### 3.3 Volumen der Zentralkapseln, bezogen auf die Feuchtmasse filtrierter Sporopolleninkapseln

Sporopolleninkapseln wurden mit dem Standard-Phosphatpuffer gesättigt und auf einem Nylonfilter, wie oben (3.3) beschrieben, gesammelt. Ein Gramm filtrierter Masse wurde mit 1 mL Standard-Puffer, welcher  $\alpha$ -Methylglucosid ( $16 \text{ g L}^{-1}$ ) und Dextran T70 ( $32 \text{ g L}^{-1}$ ) enthielt, gemischt und nach einigen Minuten zentrifugiert. Die originäre Lösung sowie der Überstand wurden an einer Superdex 75 HR-Säule (30 X 1 cm; Pharmacia, Uppsala, Schweden) chromatographiert (polarimetrische Detektion mit dem Chiralyser). So konnte das Verhältnis der Zucker- und Dextrankonzentrationen anhand der Peakflächen bestimmt werden. Der Volumenanteil  $\gamma$  der Zentralkapseln in der Feuchtmasse (FM) ergibt sich aus dem Verhältnis  $r$  (Mengenverhältnis von Zucker und Dextran im Überstand) und dem Verhältnis  $r'$  (Mengenverhältnis von Zucker und Dextran in der originären Lösung) nach der folgenden Formel, da sich der Zucker im gesamten Flüssigkeitsvolumen und das Dextran nur in dem Volumen außerhalb der Zentralkapseln verteilt:

$$\gamma = 1 - (1,94 r / r' - 1) \quad (1)$$

Der Wert 1,94 ergibt sich aus dem Trockenmasseanteil an der gefilterten FM (6 %).

### 3.4 Polarimetrische Aufzeichnung der Permeation optisch aktiver Stoffe und des Wassers

Die mit der Permeation von Zuckern und Dextranen in das Lumen der Sporopolleninkapseln verbundenen Konzentrationsänderungen wurden in ihrem Zeitverlauf in Anlehnung an ein bereits beschriebenes System [Ehwald et al., 1973a; Ehwald et al., 1973b; Fleischer und Ehwald, 1995] registriert. Das air-lift-System (Abb. 5) wurde so modifiziert, dass eine höhere Umlaufgeschwindigkeit im partikelfreien Medium möglich war.

In dem verwendeten System (Abb. 5) durchmischte ein wassergesättigter Luftstrom (ca.  $40 \text{ mL min}^{-1}$ ) die Suspension und bewegte das partikelfreie Medium über PE-Schläuche (1 mL) durch eine Quarzküvette (1 mL) zurück in das Inkubationsgefäß. Das gesamte Flüssigkeitsvolumen betrug 8-10 mL, der Fluss durch die Messküvette  $20\text{-}30 \text{ mL min}^{-1}$ . Der Drehwinkel wurde mit dem Perkin & Elmer-Polarimeter 141 M bei  $\lambda = 365 \text{ nm}$  (Hg-Linie) mit einer Absolutgenauigkeit von  $\pm 0,001^\circ$  (0,2 %) gemessen und entweder analog an einen Schreiber oder über eine Analog/Digitalwandlerkarte in eine Tabellenkalkulation ausgegeben. Für die Aufzeichnung der Kinetik der Permeation von Zuckern aus dem Lumen der Zentralkapseln, zur Messung des Verteilungsraumes von Dextran T70 (Oberflächenfilm und Luftsäcke) oder zur Erfassung der Abgabe optisch aktiver Stoffe aus Pollen während der Quellung wurde die Konzentrationsänderung durch Zugabe einer abgewogenen Menge der mit den entsprechenden Lösungen äquilibrierten Kapseln oder der Pollen in das Inkubationsgefäß ausgelöst. Gereinigte Sporopolleninkapseln (3.2.2) wurden mit der jeweiligen Zucker- oder Dextranlösung für drei Tage gesättigt, dabei erfolgte die Zugabe des Zuckers sehr langsam ( $0,01 \text{ mol h}^{-1}$ ). Die vorgesättigten Kapseln wurden durch Vakuumfiltration auf einem Nylonsieb (Porengröße  $20 \mu\text{m}$ ) gesammelt und nach einer Filtrationszeit von 30 s in einem Röhrchen ( $d = 8 \text{ mm}$ ) gewogen (ca. 1 g) und aufbewahrt.

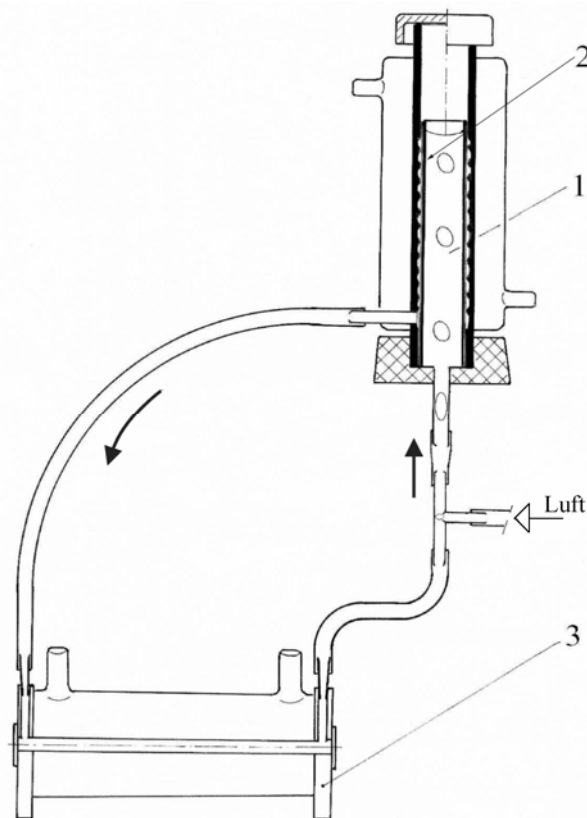


Abb. 5: Luftgetriebenes Kreislaufsystem für wässrige Lösungen von optisch aktiven Substanzen, deren Konzentration polarimetrisch registriert wird. (1) thermostatiertes und belüftetes Inkubationsgefäß, das die Kiefernexinen aufnimmt, (2) zylindrischer Partikelfilter, welcher derart eingepasst ist, dass er den geriffelten Drainagebereich sowie den Ringkanal vor dem Filtratauslass bedeckt, (3) thermostatierte Küvette (1 mL).

Aus diesem Röhrchen konnten die Partikel (filtrierte Masse) in wenigen Sekunden in das Inkubationsgefäß überführt werden. Wurden vitale Pollenkörner (150 mg, lufttrocken) untersucht, so wurden sie vor Zugabe in das Inkubationsgefäß in Siliconöl AS4 suspendiert, s. 3.2.6. Die Zugabe der Partikel erfolgte hier in Form der Suspension, die aus dem Eppendorf-Röhrchen möglichst schnell quantitativ in die Dextranlösung überführt wurde. Osmotisch induzierte Volumenänderungen der Zentralkapsel wurden durch Zugabe des Osmotikums (nur geringfügige Absenkung des Wasserpotential 0,9-1,8 kPa) in die Suspension von Sporopolleninkapseln induziert. Die gewählte Menge des Osmotikum befand sich in einer Dextranlösung, deren Drehwinkel mit derjenigen der Dextranlösung im air-lift-System genau übereinstimmte. Um Schlieren zu vermeiden wurde der Fluss während der Probenzugabe unterbrochen. (Absperren der Luftzufuhr). Die Kalibrierung der Drehwinkel erfolgte im Anschluss an jedes Experiment durch Zugabe von 100  $\mu\text{L}$  Wasser oder Substanzlösung.

### 3.5 Gelchromatographische Permeatanalyse zur Erfassung von Permeabilitätskoeffizienten von Dextrangrößenfraktionen

Der Austausch von Dextranfraktionen mit der Zentralkapsel wurde untersucht, indem ein Diffusionsexperiment mit der Gelpermeationschromatographie (GPC) einer polydispersen Dextran-Beprobungslösung (DPS) kombiniert wurde [Woehlecke und Ehwald, 1995]. Die Zusammensetzung der verwendeten DPS ist in Tabelle 1 angegeben.

Sporopolleninkapseln wurden zehn Tage in einem großen Volumen DPS geschüttelt, dann mittels Vakuumfiltration gesammelt und getrocknet (s. 3.7). Die Proben der filtrierte Masse (150 mg) wurden für unterschiedliche Intervalle mit 450  $\mu\text{L}$  Standard-Phosphatpuffer inkubiert. Die DPS wurde vor und nach der Inkubation mittels GPC analysiert. Die Zeitskala der Elugraphen wurde anhand einer Säulenkalibrierung mit geeigneten Standardproteinen computergestützt in Stokes' sche Radien transformiert [Dautzenberg et al., 1999].

Tabelle 1: Zusammensetzung der Dextran-Beprobungslösung (DPS)

Bestandteil	Hersteller	Stokes' scher Radius der höchst- konzentriertesten Größenfraktion * [nm]	Konzentration in der Probenlösung [mg mL <sup>-1</sup> ]
Dextran T70	Pharmacia, Uppsala, Schweden	4,56	0,900
Dextran T20		3,99	0,975
Dextran 15	Serva, Heidelberg, Deutschland	3,61	1,125
Dextran 8		2,46	3,000
Dextran 4		1,99	0,750
Dextran 4, 24 h hydrolysiert **		1,50	0,750
Dextran 4, 48 h hydrolysiert **		1,24	1,050
$\alpha$ -Methylglucosid	Fluka, Buchs, Schweiz	0,38	0,525

\* erhalten durch GPC an einer kalibrierten Superdex-75-HR-Säule am Peakmaximum.

\*\* 0,06 M Schwefelsäure, 80 °C.

Die Austauschrate wurde aus der Größenabhängigkeit des Quotienten  $q = C/C'$  gewonnen, wobei  $q'$  den Maximalwert (impermeable Fraktion, d.h. „Dextran-T70-Peak“) darstellt, der aus den Peaks von Dextran T70 als Leer- bzw. Totvolumen erhalten wurde, und  $p''$  den Minimalwert (vollständig ausgetauschte Fraktion, d.h. „Zuckerpeak“), der aus den Peaks des  $\alpha$ -Methylglucosids erhalten wurde. Die Austauschquotienten  $q$  lassen sich für bestimmte Austauschraten  $\gamma$  (0,33; 0,50 und 0,66; s. Abb. 13 B) graphisch erhalten. Die Austauschrate  $\gamma$  bezieht sich auf den anteiligen Austausch der Größenfraktionen, die gemeinsam mit dem Stokes'schen Radius aus den an der kalibrierten Superdex-Säule (75-HR, Pharmacia) ermittelten Elugrammen abgelesen wurden; dabei entspricht  $q'$  einem nahezu vollständigen Ausschluss  $\gamma \leq 0,10$ , die Halbwertszeit einem Gamma von 0,5 und  $q''$  entspricht einem nahezu vollständigen Austausch  $\gamma \geq 0,90$ .

### 3.6 Größenausschlusschromatographie mit Sporopolleninkapseln

#### 3.6.1 Füllen der Chromatographiesäulen

Als Chromatographiesäulen dienten die Leersäulen HR10/30 (30 X 1 cm) und HR16/5 (5 X 1,6 cm) der Firma Amersham Biosciences. Die Säulen wurden mit der Pumpe der HPLC-Anlage von Shimadzu bei einem Druck von 8 bis 9 kPa und einer Fließgeschwindigkeit von 2 mL min<sup>-1</sup> mit Sporopolleninkapseln in Form einer wässrigen Suspension (300-310  $\mu\text{m} \pm 2 \mu\text{m}$ ) gepackt. Bei Flussraten bis 25 mm min<sup>-1</sup> und Drücken bis 16 kPa blieb das Volumen (23,5  $\pm$  0,16 mL) der erhaltenen Festbetten weitestgehend konstant (vgl. Abb. 15).

#### 3.6.2 Analyse der Chromatogramme: Flussratenabhängige Peakverbreiterung bei Elution von (niedermolekularen) Lösungen an gepackten Sporopolleninkapseln

Die mit Sporopolleninkapseln gepackte Säule war mit einer computergesteuerten HPLC-Einheit von Shimadzu und einem RI-Detektor (ERC7512) verbunden. Für die Bestimmung der Permeabilität der Zentralkapsel für verschieden große Moleküle wurde die Peakverbreiterung in Abhängigkeit von der Flussrate untersucht. Dazu wurden die niedermolekularen Substanzen (Alkanole, Ethylenglykol, Glycerol, Alanin und Zucker) in Wasser ( $c = 10 \text{ g L}^{-1}$ ), die größeren Moleküle (Proteine und Dextranpolymere) in HPLC-Puffer gelöst ( $c = 1 \text{ g L}^{-1}$ ), 50  $\mu\text{L}$  Lösung der zu untersuchenden Probe aufgetragen und mit gasfreiem Wasser bzw. Phosphatpuffer bei konstanten Flussraten zwischen 0,125 und 0,75 mL min<sup>-1</sup> (lineare Flussraten von 27 bis 163  $\mu\text{m s}^{-1}$ ) eluiert. Für jede Substanz wurde die Peakvarianz (bei 60,7 % der Peakhöhe) für die oben genannten Flussraten graphisch bestimmt. Die verwendete Flussrate wurde genügend klein gewählt, so dass das relative Elutionsvolumen nicht infolge unvollständiger Äquilibration mit der stationären Phase reduziert wurde. Das Elutionsvolumen wird auf das gesamte Säulenvolumen bezogen. Das Totvolumen  $V_{\text{tot}}$  wurde be-

stimmt, indem die Säule kurzgeschlossen, d.h. die Säulenzuleitung an der Schraubverbindung getrennt und direkt mit dem Einlass des RI-Detektors verbunden wurde. Bei einer Fließgeschwindigkeit  $v$  von  $0,05 \text{ mL min}^{-1}$  wurde eine stark verdünnte Probe ( $0,1\text{-}0,2 \text{ g L}^{-1}$ ) aufgetragen und deren Retentionszeit  $t_{\text{tot}}$  erhalten. Aus  $v$  und dem nach der Zylinderformel berechnetem Volumen der Schraubverbindung (bis zur HPLC-Säule und vom Säulenauslass bis zum Einlass des Detektors) konnte für  $V_{\text{tot}}$  ein Volumen von  $267 \text{ }\mu\text{L}$  berechnet werden. Dies wurde zum Säulenvolumen addiert. Es wurde darauf geachtet, dass das externe Volumen weniger als 1,1 bzw. 2,6 % des Volumens der Packung betrug.

### 3.7 Initialraten der osmotisch induzierten Wasserabgabe aus wassergesättigten Zentralkapseln

Die Sporopolleninkapseln (3.2.2) wurden mit einer 3 %igen Lösung von Dextran T70 äquilibriert. Zum Zeitpunkt Null wurden der Suspension Dextranlösungen genau gleicher Dextrankonzentration mit bekanntem osmotischem Potential zugegeben. Nach kurzen Inkubationsperioden (10-20 s) wurden die Partikel durch Vakuumfiltration durch ein geeignetes Nylon-Tuch ( $10 \text{ }\mu\text{m}$  Maschenweite) von der Flüssigkeit getrennt. Aus der Konzentrationsänderung der Dextranlösung, der Inkubationszeit, dem Volumen der Zentralkapseln in der Probe und dem Verhältnis zwischen Oberfläche und Volumen der Zentralkapseln und dem osmotischen Potential des Mediums ( $0,9\text{-}1,8 \text{ kPa}$ ) wurden die Ultrafilterkoeffizienten der Exine an der Zentralkapsel für das jeweilige Osmotikum berechnet.

Ein bestimmtes Volumen der Suspension  $V_{\text{Suspension}}$  ( $4,5\text{-}4,9 \text{ mL}$ ) wurde für kurze Zeit (meist 10 s) mit  $0,1$  bis  $0,5 \text{ mL}$  konzentrierter Osmotikallösung  $V_{\text{Osmotikum}}$ , welche das Dextran in derselben Konzentration enthielt (Abweichung des Drehwertes  $< 0,01^\circ$ ), geschüttelt und rasch durch ein trockenes Nylonsieb unter Vakuum filtriert, zentrifugiert und der Drehwinkel  $\alpha$  des Überstands gemessen. Der Referenzwinkel  $\alpha'$  wurde erhalten, indem die osmotisch wirksame Dextranlösung mit dem Überstand der zentrifugierten Suspension gemischt wurde. Die osmotisch induzierte Volumenänderung der Zentralkapsel  $\Delta V$  wurde aus polarimetrischen Messungen erhalten:

$$\Delta V = (V_{\text{Suspension}} + V_{\text{Osmotikum}}) [(\alpha' - \alpha) / \alpha'] \quad (2)$$

Um die Schrumpfrate  $r = \Delta V / V$  in den ersten 10, 12 oder 20 s ermitteln zu können, musste der Volumenanteil der wassergesättigten Zentralkapseln  $V_C$  in der Ausgangs-Suspension bekannt sein. Er wurde bei der Herstellung dieser Suspension folgendermaßen bestimmt: Die filtrierte Masse ( $50 \text{ g}$ ) wassergesättigter ( $0,94 \text{ mL H}_2\text{O g}^{-1} \text{ FM}$ ) Sporopolleninkapseln  $m_{\text{Kapseln}}$  wurde mit dem gleichen Volumen  $V_{\text{Dextran}}$  ( $50 \text{ mL}$ ) einer Dextran T70-Lösung ( $60 \text{ g L}^{-1}$ ,  $\alpha_0 = 31,850 \pm 0,010^\circ$ ) gemischt und anschließend durch Zentrifugation abgetrennt. Aus der hierbei erfolgten Verdünnung des Dextrans wurde das Dextranausschlussvolumen, das dem Volumen der Zentralkapseln in der Stammlösung entspricht, berechnet. Der Drehwinkel des Überstands  $\alpha_1$  wurde auch dazu genutzt, um das Wasservolumen zu berechnen, das zugefügt werden musste um die standardisierte Dextrankonzentration ( $30 \text{ g L}^{-1}$ ) in der Versuchslösung zu erhalten.

Der Ultrafilterkoeffizient ( $L_{PD}$ ) wurde berechnet aus der Änderung des osmotischen Drucks ( $\Delta \pi$ ), der Rate ( $r$ ), der Versuchszeit  $\Delta t$  und dem Volumen/Oberflächenverhältnis ( $\beta$ , s. 3.2.3):

$$L_{PD} = \frac{r\beta}{\Delta \pi} \quad (3)$$

### 3.8 Konzentrationsänderung beim Quellen trockener Exinefragmente in Dextran- und Zuckerlösungen

Lyophilisierte Exinefragmente ( $200 \text{ mg}$ ) wurden mit  $6 \text{ mL}$  der jeweiligen Dextran- oder Zuckerlösung (je  $30 \text{ g L}^{-1}$ ) in dicht schließenden Polyethylenröhrchen ( $15 \text{ mL}$ -Falconröhrchen) drei Tage bei RT geschüttelt. Anschließend wurde die Flüssigkeit durch Zentrifugation ( $11400 \text{ g}$ ) abgetrennt. Der Überstand musste nochmals zentrifugiert werden, um die für eine genaue polarimetrische Messung

erforderliche Transparenz zu erreichen. Vor dieser zweiten Zentrifugation wurden, um Luftbläschen aus den Fragmenten zu entfernen, die verschlossenen Röhrchen in ein Ultraschallbad gestellt. Dextran- und Zuckerkonzentrationen der Ausgangslösung bzw. des Überstandes wurden bei 25 °C mit einer relativen Genauigkeit von mindestens 0,2 % mit einem Perkin & Elmer-Polarimeter 141 M bei  $\lambda = 365 \text{ nm}$  (Hg-Linie) gemessen.

### **3.9 Gas-Durchbruchspannung an flüssigkeitsgesättigten Säulenfüllungen von Sporopolleninkapseln**

Eine Suspension intakter Sporopolleninkapseln wurde in der jeweiligen Flüssigkeit (Wasser, Ethanol, n-Heptan) auf einen Polypropylenfilter in eine Glassäule (Durchmesser 7 mm, Höhe 25 mm) zu einem dichten Festbett gepackt. Die Packung wurde mit 5 mL der jeweiligen Flüssigkeit bei definiertem Unterdruck (50 hPa) gewaschen; dabei wurde darauf geachtet, dass das Bett mit Flüssigkeit bedeckt blieb. Vor jeder Messung wurde die über dem Festbett stehende Flüssigkeit ohne Luftdruckdifferenz abgelassen, so dass sie kapillar bei geringem Schweredruck ( $< 200 \text{ Pa}$ ) gehalten wurde. Daraufhin wurde entweder der Luftdruck in der Flasche langsam verringert oder der Luftdruck oberhalb des Bettes langsam erhöht bis die mobile Flüssigkeit aus dem Interpartikelraum austrat und Luft nachgesaugt wurde. Dies führte zum Druckabfall. Die hierfür erforderliche kritische Druckdifferenz wurde mit einem Drucksensor (AktivSensor GmbH) bestimmt.

### **3.10 Gravimetrische Evaporationsmessung**

Wässrige Suspensionen von gereinigten Exinekapseln und vitalen Pollenkörnern wurden auf einer Analysewaage (Sartorius AG), Genauigkeit  $\pm 1 \text{ mg}$ , getrocknet. Zur Beschleunigung der Evaporation wurde die Probe mit  $250 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  bestrahlt (Wolfram-Glühbirne), so dass Evaporationsraten von mehr als  $0,1 \mu\text{L s}^{-1}$  erreicht wurden.

### **3.11 Titration**

Aus Aceton getrocknete Sporopolleninkapseln (250 mg) wurden in 12 mL Vorlage (50 mM  $\text{K}_2\text{SO}_4$  und 3 mM  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) gequellt und für 20 min im Vakuum entgast. Parallel wurde die Vorlage ohne die Kapseln entgast. Die pH-Messung erfolgte mit einem Digital-pH-Messgerät (MV 870) und Einstab-Elektrode (InLab 410), die bei pH 2,0 und pH 7,1 kalibriert wurde. Zuerst wurden die pH-Werte der Suspension und der Blindprobe durch Zugabe von NaOH auf den gleichen pH-Wert eingestellt. Anschließend wurde unter ständigem Rühren in 10 bis 50  $\mu\text{L}$  Schritten mit einer Kolbenhub-Mikropipette 0,5 M NaOH zugegeben und der pH-Wert notiert. Um die Vergleichbarkeit der Titrationskurven von Suspension und Vorlage zu gewährleisten, wurden beide Lösungen nacheinander, erst von pH 2,6 bis etwa pH 7 und dann weiter bis pH 12, titriert.

### **3.12 Mikroskopische Techniken**

Für die Rasterelektronenmikroskopie (REM) wurden Sporopolleninkapseln oder 20  $\mu\text{m}$  dicke Gefrierbruchschnitte in Ethanol entwässert, mit 10 nm Goldpartikel besputtert und aus Tetramethylsilan luftgetrocknet. Die Bilder wurden mit einem Rasterelektronenmikroskop (Leica S360) aufgenommen. Für die Konfokale Laserraster-Mikroskopie wurde das Gerät Leica CLSM oder die konfokale Laserrastereinheit LSM 510 META kombiniert mit einem Axiovert 200 M Mikroskop von Zeiss eingesetzt.

### **3.13 Analyse der Formänderung bei der Rehydratation vitaler Pollenkörner**

10 mg lufttrockener Pollenkörner wurden in einem Eppendorf-Röhrchen in 100  $\mu\text{L}$  Siliconöl AP100 suspendiert, wobei sich die Luftsäcke spontan mit dem Öl füllten (vgl. 3.2.6). Anschließend wurde 1 mL einer Calciumchloridlösung (20 mM) hinzugesetzt und geschüttelt, wobei die Körner in der wässrigen Phase dispergiert vorlagen. Nach der angegebenen Zeit wurden die Dispersionen bei 13000 g zentrifugiert. Zwanzig Sekunden reichten aus, um alle Körner aus der wässrigen Umgebung (obere Phase) in das Siliconöl (Bodenphase) zu überführen. Nach der oben beschriebenen Probennahme wurde das Öl mit den lufttrockenen Pollenkörnern oder mit solchen, welche für verschieden lange Zeiten rehydratisiert wurden, zwischen Objektträger und Deckglas ausgebreitet und mit Nagellack versiegelt. Die Autofluoreszenz des Sporopollen-

ins (Exzitationswellenlänge 543 nm, Emission: > 560 nm) wurde genutzt, um etwa 100 optische Schnitte durch die Exine (< 0,5  $\mu\text{m}$ ) jedes Pollenkorns zu gewinnen. Mit dem 3D-Werkzeug von Zeiss (Image Browser 3.2.0.70 SP2, Oberkochen, Deutschland) wurde aus einem Z-Stapel von diesen Schnitten die Oberfläche gerendert.

### **3.14 Vitalitätsbestimmung von Pollen**

Die kombinierte Vitalitätsbestimmung erfolgte mit Fluorescein-Diacetat (FDA, Positiv-Test auf intrazelluläre Esterase) und mit Propidiumiodid, (PI, Negativ-Test, Kernfärbung auf der Grundlage der Zerstörung der Plasmamembran) nach der Vorschrift von Heslop-Harrison und Shivanna [Shivanna und Heslop-Harrison, 1981; Shivanna und Rangaswamy, 1992].

Für ein rasches Wechseln der Quellungsmedien und Testlösungen wurde der Pollen (1 mg) in 5  $\mu\text{L}$  Siliconöl AP100 (vgl. 3.2.6) aufgenommen, so dass er leicht sedimentierte. Der so präparierte Pollen wurde für 20 min in 100  $\mu\text{L}$  der zu untersuchenden Quellungslösung (mit/ohne  $\text{CaCl}_2$ , PEG) geschwenkt, zentrifugiert und dekantiert und für 60 min mit den Testlösungen (PI oder FDA); die Ergebnisse wurden mit dem TTC-Test ( $\text{pH}$  6-7,  $c = 10 \text{ g L}^{-1}$ ) überprüft.

### **3.15 Osmometrie, Analytik**

Der osmotische Druck der Pollenextrakte, erhalten durch Kochen der Pollenkörner in deionisiertem Wasser, wurde ebenso wie der von verschiedenen Medien mit einem Gefrierpunkt-Osmometer (Knauer GmbH, Berlin) bestimmt. Saccharose und Glucose in Pollenextrakten wurde enzymatisch mit Invertase und Glucose-Oxidase (Sigma Diagnostics) bestimmt.



## 4 Ergebnisse

### 4.1 Untersuchungen an Sporopolleninkapseln

#### 4.1.1 Permeation von niedermolekularen Substanzen, Polymeren und Partikeln

##### 4.1.1.1 Zentralkapsel und Luftsäcke

Für die Charakterisierung der Sporopolleninkapseln ist die Bestimmung der Größenverhältnisse unerlässlich. Das Verhältnis von Volumen (V) zu Oberfläche (A) geht in die Berechnung von Permeabilitätskoeffizienten ein. So wurde die annähernd ellipsoide Zentralkapsel morphometrisch untersucht, indem Ausdrücke lichtmikroskopischer Aufnahmen von dichten Suspensionen der Sporopolleninmikrokapseln vermessen wurden. Die zwei kurzen Durchmesser (b und c in Abb. 6) wurden entweder von Aufsichten oder von Seitenansichten erhalten; der Durchmesser b ist der kleinere (obere Skizze in Abb. 6), so dass die Kapsel distal abgeflacht ist. Eine Abschätzung von V/A erfolgte gemäß:

$$\frac{V}{A} = \frac{\sqrt[3]{abc}}{6} \quad (4)$$

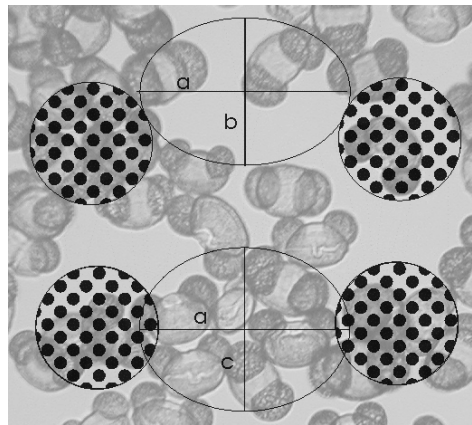


Abb. 6: Modellskizze für die morphometrische Untersuchung der ellipsoiden Zentralkapseln. Die dargestellten Durchmesser a, b und c (Werte in Tabelle 2) wurden an lichtmikroskopischen Aufnahmen der sedimentierten Kapseln (in Aufsicht oder Seitenansicht) bei definiertem Abbildungsmaßstab mit einem Messschieber vermessen. Dabei erhält man die beiden kleinen Durchmesser b und c entweder von Seitenansichten (b, oben) mit dem distalen Pol nach unten, oder von Aufsichten (c, unten) und den langen Durchmesser (a) aus beiden Ansichten.

Die Zentralkapsel von *P. nigra* ist für alle drei Durchmesser größer als die von *P. sylvestris* L (Tabelle 2). Dabei stimmen die Verhältnisse der Durchmesser  $a/b = 1,4$  und  $c/b = 1,1$  bei beiden Arten auffallend gut überein. Das Volumen der Zentralkapsel beträgt bei *P. sylvestris*  $1,42 \cdot 10^{-5} \text{ mm}^3$  (14,2 Pikoliter) und bei *P. nigra*  $1,97 \cdot 10^{-5} \text{ mm}^3$  (19,7 Pikoliter). Der Äquivalentradius, d.h. der Radius einer Kugel mit dem Volumen der Zentralkapsel, vgl. Gleichung (4),

$r = 1/6 \sqrt[3]{abc}$  beträgt bei *P. sylvestris* 15,05  $\mu\text{m}$  und bei *P. nigra* 16,75  $\mu\text{m}$ .

Die Luftsäcke sind nahezu kugelförmig und mit einem Radius von etwa 9  $\mu\text{m}$  deutlich kleiner als die Zentralkapsel.

Die dreiteiligen Sporopolleninkapseln sind aus verschiedenen Exineschichten aufgebaut (vgl. Abb. 3). Die beiden inneren Schichten, die das Lumen der Zentralkapsel auskleiden, wurden Nexine genannt, die äußeren Schichten bilden zusammen die Sexine [Straka, 1975; Rowley et al., 2000b]. Die Sexine grenzt den Corpus bzw. Zentralkapsel nach außen ab. Sie ist an den Seiten von der Nexine abgelöst und erweitert und bildet so die Luftsäcke (Sacci). Hier und auch an der übrigen Fläche, wo sie mit der Nexine der Zentralkapsel in Verbindung steht, ist die Sexine aus Columellae und Tectum aufgebaut. In Abb. 7 sind rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von gereinigten Mikrokapseln bzw. deren Gefrierschnitte (Abb. 7 C-G) dargestellt; vollständige Kapseln sowie einige Sacci sind infolge Trocknung kollabiert (Abb. 7 A und B). In Abb. 7 A ist eine Mikrokapsel mit den Sacci nach oben orientiert. Die Oberflächenskulptur der Sacci erscheint ähnlich

einer Honigwabe ornamentiert. In Großaufnahmen (Abb. 7 E und G) erkennt man, dass das nur dünne Tectum zerstreut von zahlreichen Poren mit einer Größe von ca. 0,2  $\mu\text{m}$  durchbrochen wird.

Tabelle 2: Das Verhältnis zwischen Volumen V und Oberfläche A der Zentralkapsel. Das Verhältnis V/A wurde aus den Durchmessern a, b und c (vgl. Abb. 6) nach Gleichung (4) berechnet. Mittelwerte mit Standardabweichungen, n = Anzahl der Messungen

	Durchmesser [ $\mu\text{m}$ ]			V/A [ $\mu\text{m}$ ]
	a	b	c	
<i>Pinus sylvestris</i>	$37 \pm 3,5$	$26 \pm 2,4$	$29 \pm 3,5$	5,01
n	129	90	41	
<i>Pinus nigra</i>	$41 \pm 4,1$	$29 \pm 3,0$	$32 \pm 3,1$	5,58
n	123	86	38	

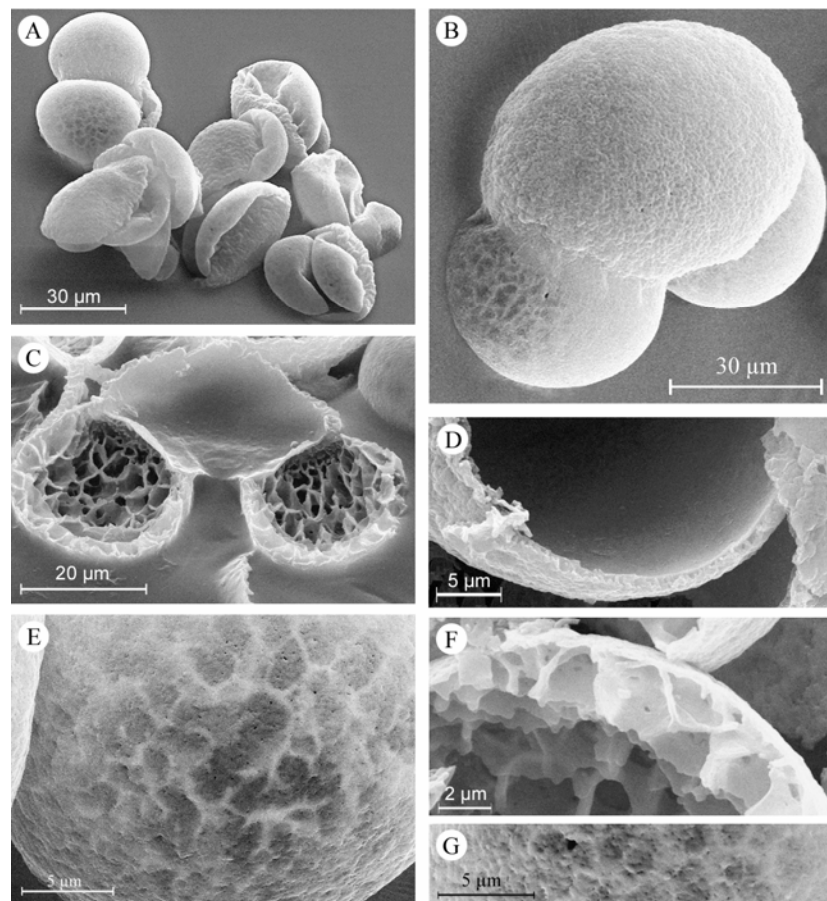


Abb. 7: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von ganzen, getrockneten Sporopollenin-kapseln und Exine-Gefrierschnitten von Kiefernpollen (*P. sylvestris*). (A, B) intakte getrocknete Kapseln, (C-D, F) Gefrierschnitte durch die Exine, (E, G) vergrößerte Ansicht der Oberfläche der saccalen Exine. Die Oberflächenskulptur der alveolaren Ectexine ist an den Sacci gröber als an der Zentralkapsel (B). Während die Innenansicht der Luftsäcke die Wabenstruktur der Columellae zeigt, erscheint diejenige der Endexine in der Zentralkapsel glatt (C, D). Die wabenartige, nach innen offene Stützstruktur (Columellae) und die Dachsicht (Tectum) der Sexine an den Sacci ist in F erkennbar. Das Tectum weist zahlreiche feine Poren auf, deren Weite unter 1  $\mu\text{m}$  liegt (E, G). Die Kapseln oder 20  $\mu\text{m}$  dicke Gefrierbruchscheiben sind mit 10 nm Goldpartikeln besputtert. Die Bilder wurden mit einem Leica REM-S360 gemacht.

Die unregelmäßig netzartige Struktur der Sacci geht auf Leisten (Columellae) zurück, die von einem Tectum nach innen vorspringen (alveolat). In tangentialen Gefrierbrüchen wird die Schichtung der Exine deutlich. Die Stützstrukturen der Columellae sind zu ihrem Lumen hin offen (Abb. 7 C und F). Nexine und Sexine sind an der Zentralkapsel etwa 2  $\mu\text{m}$  mächtig. Die Oberfläche der Zentralkapsel wird, wie die der Sacci, von einer makroporösen Sexine gebildet (Abb. 7 B), deren Columellae aber kürzer sind und dichter beieinander liegen.

#### 4.1.1.2 Permeation von niedermolekularen Farbstoffen sowie markierten Makromolekülen und Mikropartikeln

Die Diffusion von Farbstoffen, fluoreszenzmarkierten Dextranen und Latexpartikeln in die Zentralkapsel und in die lateralen Sacci wurde mit Fluoreszenzmikroskopie (Abb. 8) und Lichtmikroskopie (Abb. 9) untersucht.

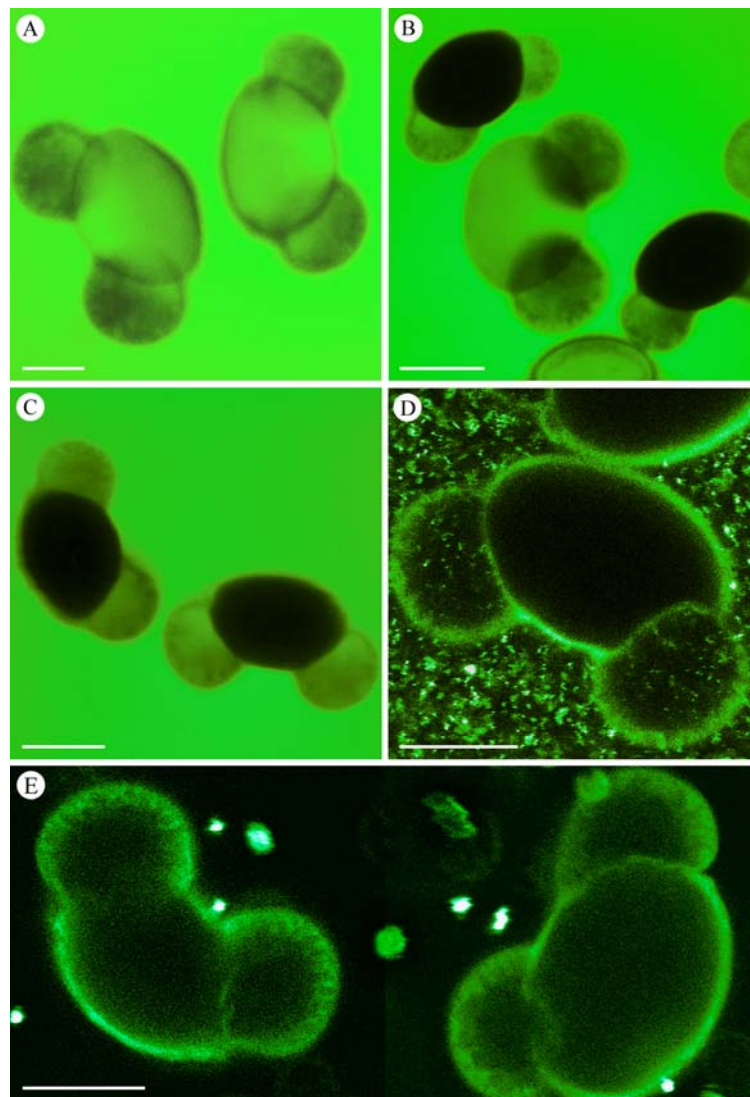


Abb. 8: Verteilung von niedermolekularen Farbstoffen, gefärbten Polymeren und Partikeln in Sporopolleninkapseln. (A) Carboxyfluorescein ( $c = 0,01 \text{ g L}^{-1}$ ,  $M_r = 376,3 \text{ g mol}^{-1}$ ) permeiert durch die Exine der Zentralkapsel (3 h). (B, C) FITC-Dextran ( $c = 0,4 \text{ g L}^{-1}$ ,  $M_r = 282 \text{ kDa}$ ) dringt nur in zerstörte Kapseln ein, intakte Zentralkapseln schließen FITC-Dextran aus (3 h). (D) FITC-markierte Submikrometerpartikel mit Durchmessern bis ca.  $0,2 \mu\text{m}$  permeieren in die Sacci (Latexpartikel,  $c = 0,26 \text{ mg L}^{-1}$ , 15 min). (E) Mikrometerpartikel mit Durchmessern von  $1,0 \mu\text{m}$  werden auch von den Sacci ausgeschlossen (FITC-markierte Latexpartikel,  $c = 0,11 \text{ mg L}^{-1}$ , 3 h). Kapseln (*P. sylvestris*) wurden in deionisiertem Wasser gewaschen und in der Farbstofflösung dispergiert und geschüttelt; Leica CLSM, Exzitation 488 nm, Emission  $535 \pm 15 \text{ nm}$ , Maßstab =  $20 \mu\text{m}$ .

In den ersten Minuten blieb Carboxyfluorescein (Natriumsalz) von leeren Zentralkapseln ausgeschlossen (nicht gezeigt); dieser Farbstoff hatte nach 3 h im Kapselinneren die Außenkonzentration erreicht (Abb. 8 A). Das FITC-Dextran mit einer mittleren Molmasse von 282 kDa wurde wie auch FITC-markiertes Serumalbumin ( $M_r = 69$  kDa, nicht gezeigt) von intakten Zentralkapseln ausgeschlossen (Abb. 8 B, C) aber beide Makromoleküle und selbst ein Teil der FITC-markierte Latexkügelchen, mit einem mittleren Durchmesser von 218 nm, tauschten mit dem Lumen der Luftsäcke aus (Abb. 8D). Latexkügelchen mit 1  $\mu\text{m}$  Durchmesser wurden jedoch von den Sacci ausgeschlossen (Abb. 8 E).

Evans Blau, ein wasserlöslicher und proteinfärbender Farbstoff mit vier Sulfonsäureresten (960 Da, Stokes' scher Radius = 1,3 nm) drang innerhalb von 3 h weder in den Corpus denaturierter Pollenkörner noch in die leeren Zentralkapseln ein, aber akkumulierte schnell in denaturierten Sporoplasmen, wenn deren Exine verletzt war (Abb. 9A-C). Evans Blau tauschte ohne erkennbare Verzögerung mit dem Lumen der Sacci aus (Abb. 9). Die Zentralkapsel schloss den Farbstoff dauerhaft aus; nur verletzte Zentralkapseln ließen den Farbstoff eindringen (Abb. 9 B). Wurde reifer Kiefernpollen für drei Tage in  $10\text{ g L}^{-1}$  Evans Blau inkubiert, so war das Cytoplasma, auch bei unverletzter Exine, leicht angefärbt (Abb. 9 D).

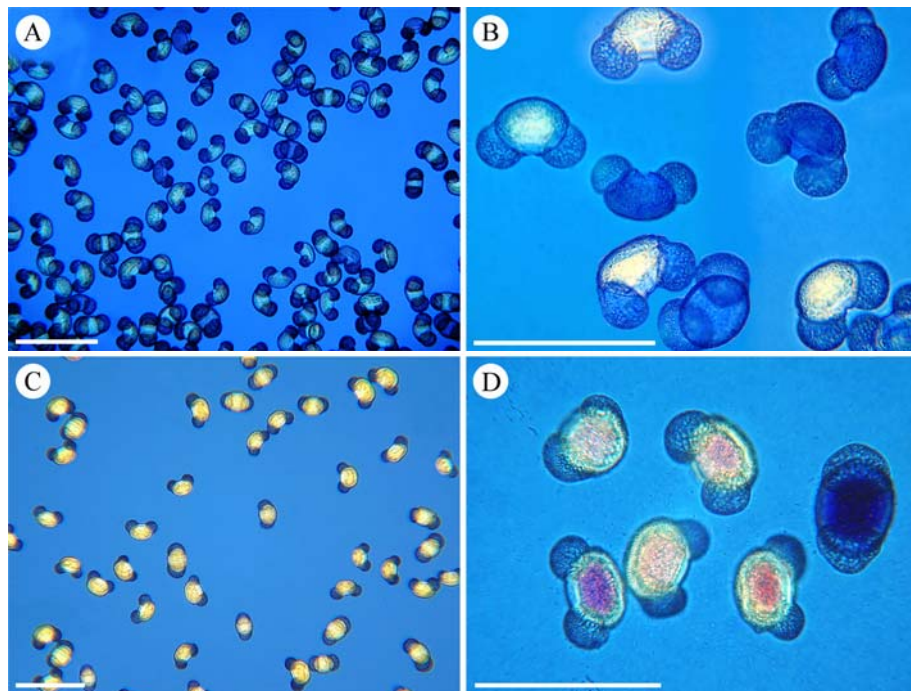


Abb. 9: Verteilung von Evans Blau in Sporopolleninkapseln und Pollenkörnern. (A) Sacci sind in Bruchteilen einer Sekunde gefärbt, intakte Zentralkapseln schließen den Farbstoff aus (3 h). (B) wie in (A) wobei im gewählten Ausschnitt verletzte Kapseln überrepräsentiert sind. (C) der Corpus der Pollenkörner schließt Farbstoff länger als 3 h aus. (D) das Cytoplasma intakter Pollenkörner wird erst nach (3 d) Tagen angefärbt; Sporopolleninkapseln (A, B) und reife Pollenkörner (C, D) von *P. sylvestris* (A) und *P. nigra* (B-D). Maßstab = 100  $\mu\text{m}$ .

Die untersuchten Kiefernspesies *P. sylvestris* und *P. nigra* zeigten bei den verwendeten Farbstoffen und Partikeln keine Unterschiede hinsichtlich ihrer Permeabilität bzw. Ausschlussvermögen.

#### 4.1.1.3 Permeation von Dextran T70 und Zuckern

Anhand der bereits dargestellten Versuche ist erkennbar, dass die Luftsäcke lediglich extrem große Partikel ausschließen und ihre Hülle selbst für Makromoleküle hochpermeabel ist, während die Zentralkapsel, welche von einer geschlossenen Nexine ausgekleidet ist, ein Ultrafilter mit sehr geringer Permeabilität für das Evans-Blau darstellt. Um die Permeabilität der Zentralkapsel zu quantifizieren wurde der Stoffefflux mit einer polarimetrischen Methode (Abb. 5) analysiert.

Intakte Sporopolleninkapseln, die 30 Tage in einer Dextranlösung T70 ( $30\text{ g L}^{-1}$ ,  $70000\text{ g M}^{-1}$ ,  $2\text{ g}$

L<sup>-1</sup> Natriumazid;  $\alpha^\circ = +15,850^\circ$ ) äquilibrierten, gaben das Polymer so schnell an Wasser ab (Abb. 10), dass die Kinetik mit der verwendeten Methode nicht ausreichend aufgelöst werden konnte.

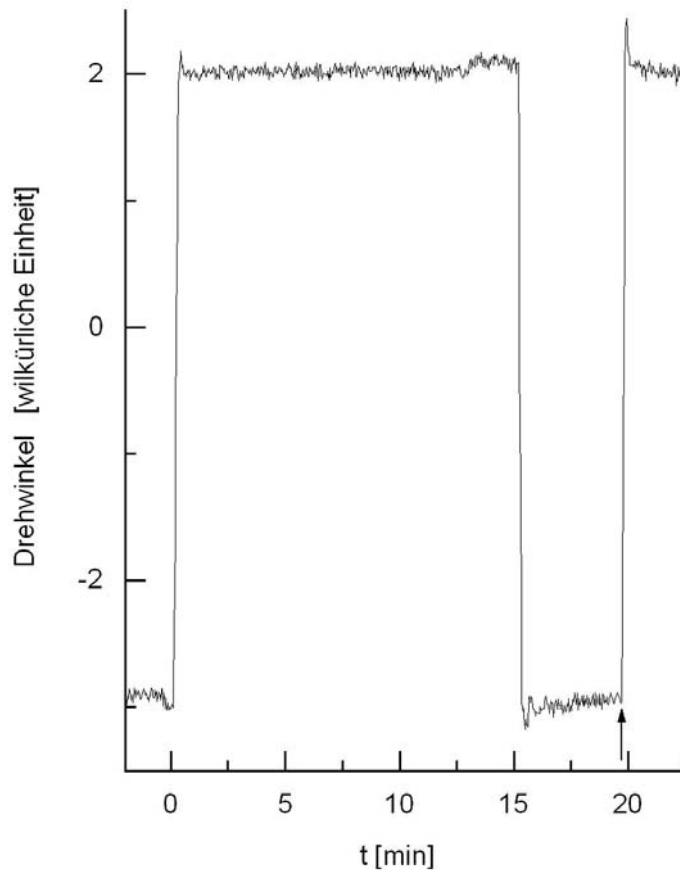


Abb. 10: Efflux von Dextran T70 aus vorgesättigten Sporopolleninkapseln in reines Wasser. Zum Zeitpunkt Null wurden 304 mg filtrierte Sporopolleninkapseln (*P. sylvestris*), welche zuvor für 30 Tage in einer Lösung von 30 g L<sup>-1</sup> Dextran T70 äquilibrierten, zu 8 mL Wasser im Messsystem gegeben. Pfeil: Kalibrierung mit 200  $\mu$ L Dextranlösung. In diesem Experiment maß der Verteilungsraum der Dextranmoleküle in der filtrierten Masse 0,66 mL g<sup>-1</sup>.

Das Gleichgewicht war in der kurzen Zeit (< 20 s) erreicht, die nötig war, bis sich eine Probe der freien Dextranlösung mit der wässrigen Lösung des Umlaufsystems vollständig vermischt hatte (Pfeil in Abb. 10).

Die resultierende Drehwinkeldifferenz  $\Delta\alpha$  entsprach bei einem Volumen der Sporopolleninkapseln von 320  $\mu$ L etwa der Menge von 200  $\mu$ L der zur Kalibrierung eingesetzten Dextranlösung. Die von den Partikeln abgegebene Dextranmenge entspricht derjenigen, die nach vollständiger Äquilibration mit dem Partikelzwischenraum und mit den Luftsäcken (66-67 %, vgl. Tabelle 6, S. 37) zu erwarten war. Das für den schnellen Austausch der Dextranmoleküle nicht zugängliche Volumen entspricht morphologisch dem Volumenanteil der Zentralkapseln, bezogen auf die eingesetzte Feuchtmasse. Im Langzeitversuch wurde geprüft, ob die Sporopolleninkapseln das Dextran T70 dauerhaft ausschließen. Hierzu wurden Proben der filtrierten Kapseln mit Dextranlösungen in einem definierten Volumenverhältnis gemischt und in verschlossenen Gefäßen für Zeiten bis zu einem Monat inkubiert. Der Dextranverteilungsraum blieb während dieser Zeit annähernd konstant bei einem Wert von ca. 2/3 der eingesetzten Feuchtmasse (Tabelle 3).

Zucker tauschten mit einem Verteilungsraum aus, der mit 0,94 mL g<sup>-1</sup> annähernd so groß wie das gesamte Flüssigkeitsvolumen in der filtrierten Feuchtmasse (FM) der Sporopolleninkapseln war. Die Abgabe der Zucker folgte einer zweiphasigen Kinetik (Abb. 11). Die erste, schnelle Kinetik entspricht, hinsichtlich Ausmaß (2/3 der Kapselmasse) und Dauer (< 20 s), der oben dargestellten für

Dextran T70 und beschreibt den Austausch von Zuckern und Dextranen mit diesem leicht zugänglichen Verteilungsraum ( $0,70 \pm 0,2 \text{ mL g}^{-1}$ ), der sich morphologisch aus Interpartikel- und Luftsackvolumen zusammensetzt.

Tabelle 3: Verteilungsraum einer filtrierten Masse Sporopolleninkapseln (*P. nigra*) nach dreißigtägiger Inkubation in einer Lösung von Dextran T70 ( $30 \text{ g L}^{-1}$ )

Diffusionszeit (h)	24	72	240	720
Dextran-Verteilungsraum ( $\text{mL g}^{-1}$ Feuchtmasse)	0,58	0,65	0,62	0,68

Eine zweite, langsamere Kinetik setzte etwa 30 Sekunden nach Zugabe der Kapseln ein (Abb. 11); das Ausmaß der zweiten Kinetik ist mit  $\Delta$  bezeichnet.

Die Zuckerabgabe, d.h. der Efflux der chiralen Substanz, war nach zehn (Monosaccharid) bis 45 Minuten (Trisaccharid) abgeschlossen und der resultierende Drehwinkel  $\alpha_{\max}$  im umgebenden Medium erreichte ein Plateau.

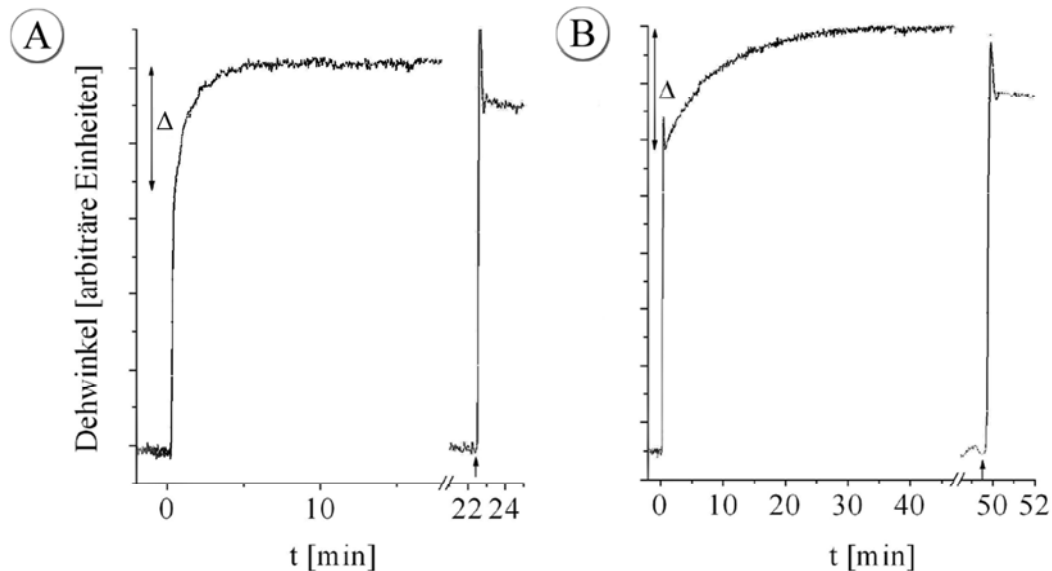


Abb. 11: Efflux von Zuckern aus zuvor beladenen, mit Flüssigkeit gesättigten Sporopolleninkapseln in reines Wasser. Zum Zeitpunkt Null wurden filtrierte Kapseln (A, 300 mg, *P. nigra*; B, 215 mg, *P. sylvestris*), die zuvor für 24 h in 0,15 M Zuckerlösung (A,  $\alpha$ -Methylglucosid, B, Raffinose) äquilibrierten, zu je 8 mL Wasser in das Messsystem gegeben; Kalibrierung mit 0,2 mL der Inkubationslösung (Pfeil).

Falls die membrankontrollierte, diffusive Stoffabgabe aus vorbeladenen Kapseln (zweite Phase in Abb. 11) einen Prozess erster Ordnung (nach dem 1. Fick'schen Gesetz) darstellt, lässt sich dieser Prozess bis zum Zeitpunkt Null ( $t_0$ ), d.h. Zeitpunkt der Kapselzugabe, extrapolieren, auch wenn er anfangs durch die Mischungskinetik überlagert wird. Der Drehwinkel  $\alpha_0$  repräsentiert die Ausgangskonzentration des Mediums ( $= 0$ ) für den Efflux aus den Zentralkapseln. Um die zweite Phase zu linearisieren, wird der natürliche Logarithmus der Differenz  $\Delta$  zwischen dem Endwert  $\alpha_{\max}$  und dem aktuellen Drehwinkel  $\alpha_t$  gegen die Diffusionszeit  $t$  aufgetragen. Die resultierende Funktion beschreibt eine Gerade mit dem Ordinatenabstand  $\ln \Delta_0$  und der negativen Steigung  $k$  als Geschwindigkeitskonstante. Aus  $\Delta_0$  und dem Endwert des Drehwinkels lassen sich die Zucker-Verteilungsräume für die erste und zweite Phase der Effluxkinetik berechnen. Dazu wurde die Kalibrierung (Abb. 12) verwendet.

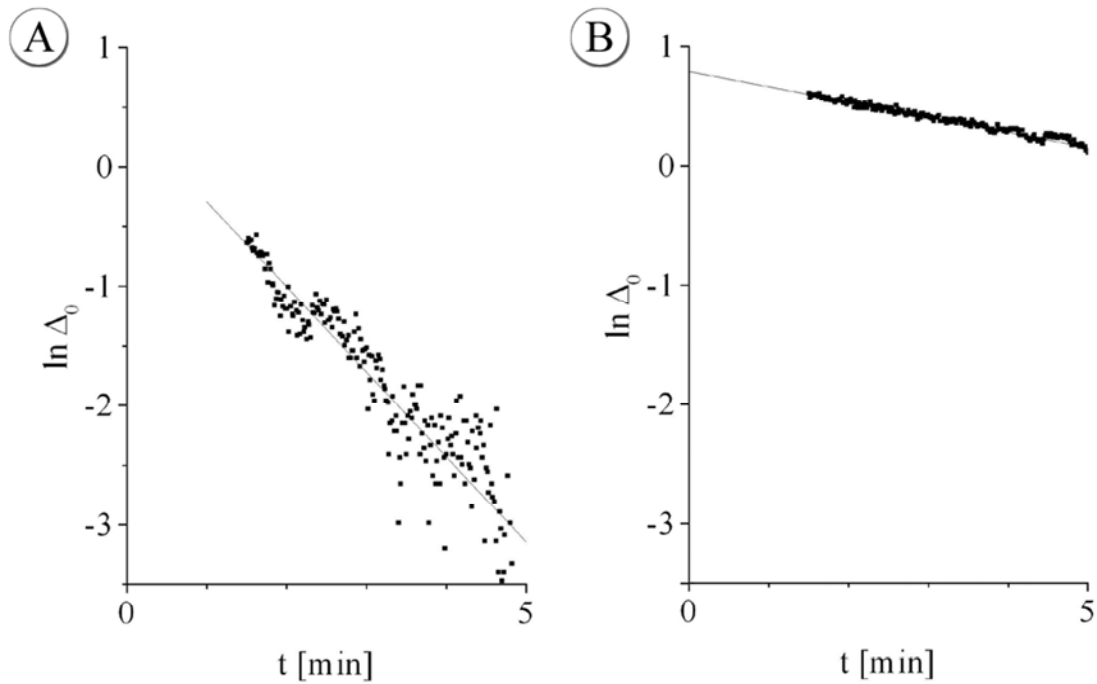


Abb. 12: Efflux von Zuckern aus vorgesättigten Kapseln. Die Differenz des finalen ( $\alpha_{\max}$ ) und des aktuellen ( $\alpha_t$ ) Drehwinkels ist gegen die Diffusionszeit ( $1,5 \geq t \geq 5$ ) halb-logarithmisch aufgetragen (vgl. Abb. 11). Das Volumen des langsam austauschenden Raums (Zentralkapsel) wurde für  $t = 0$  extrapoliert und betrug für (A)  $\alpha$ -Methylglucosid  $0,34$  ( $R = 0,93$ ) und für (B) Raffinose  $0,30 \text{ mL g}^{-1}$  ( $R = 0,99$ ).

Unabhängig von dem untersuchten Zucker erfolgte der Übergang von der ersten zur zweiten Kinetik bei einem Drehwinkel von  $\alpha_{\max} - \Delta_0$  nach wenigen Sekunden (ca. 20 s), welcher mit  $0,65$  bis  $0,71 \text{ mL g}^{-1}$  FM dem Verteilungsraum der Polymere entspricht und als Summe der Volumina von Interpartikelraum und Sacci aufgefasst werden muss. Die langsame, zweite Kinetik beschreibt den Efflux von Zuckern aus der Zentralkapsel. Der zugehörige Verteilungsraum betrug  $0,28$  bis  $0,35 \text{ mL g}^{-1}$  FM, ohne dass sich die Werte für Methylglucosid und Raffinose signifikant unterschieden; Mittelwerte sind in Tabelle 4 angegeben. Die Geschwindigkeitskonstante  $k = \ln 2 / \tau$  resultiert aus dem Regressionskoeffizienten in Abb. 12 und liefert die Halbwertszeit der Zuckerpermeation durch die Exine der Zentralkapsel. Dass es sich hierbei tatsächlich um einen membrankontrollierten Prozess handelt, zeigt der folgende Vergleich mit einem Prozess, der durch die Diffusion in der Wasserphase von den Dimensionen der Zentralkapsel limitiert wäre. Die theoretische Halbwertszeit eines solchen Prozesses  $\tau'$  kann aus der von Crank [1957] angegebenen Diffusionsgleichung (5) für einen kugelförmigen Raum abgeschätzt werden:

$$\tau' = 0,0305 \frac{r^2}{D} \quad (5)$$

Dabei ist  $D$  der Diffusionskoeffizient in Wasser (s. [Atkins, 1990] S. 628f.) und der Äquivalentradius wurde aus den drei Radien  $a$ ,  $b$  und  $c$  nach der Formel  $r = \sqrt[3]{abc}$  abgeschätzt. Der Fehler, der durch die Unterschiedlichkeit von  $a$ ,  $b$  und  $c$  für die Diffusionsgeschwindigkeit entsteht, führt zu einer Unterschätzung der Permeationsgeschwindigkeit, da die Diffusionsgeschwindigkeit in dem Ellipsoiden am stärksten durch den kleinsten Weg bestimmt wird. Führt man die Rechnung mit den Diffusionskoeffizienten der jeweiligen Zucker in Wasser durch, ergeben sich sehr kurze Halbwertszeiten (Tabelle 4).

Die gemessenen Halbwertszeiten des Zuckeraustrittes aus der Zentralkapsel sind, verglichen mit diesen Werten, um drei bis vier Größenordnungen höher. Der Unterschied ist am größten bei Raffinose. Wie zu erwarten, behindert die Exine die Diffusion von größeren Molekülen stärker als von kleinen.



Tabelle 4: Efflux von Zuckern aus zuvor beladenen Zentralkapseln

Spezies	Zucker	Verteilungs- raum <sup>*</sup> $V_p$ [mL g <sup>-1</sup> ]	Geschwin- digkeits- konstante <sup>*</sup> $k$ [s <sup>-1</sup> ]	Permea- bilitäts- koeffi- zient <sup>*</sup> $P$ [μm s <sup>-1</sup> ]	$P * M_r^{0,5}$ [nm s <sup>-1</sup> g <sup>0,5</sup> mol <sup>0,5</sup> ]	Halb- werts- zeit ge- messen <sup>*</sup> $\tau$ [s]	Halb- werts- zeit <sup>†</sup> theor. $\tau'$ [ms]
<i>Pinus sylvestris</i>	α-Methyl- glucosid	0,29 ± 0,02	0,0056 ± 0,0021	0,028 ± 0,0104	393	138	10,3
	Raffinose	0,30 ± 0,01	0,0021 ± 0,0001	0,010 ± 0,0004	231	338	15,9
<i>Pinus nigra</i>	α-Methyl- glukosid	0,34 ± 0,01	0,0112 ± 0,0021	0,062 ± 0,0116	870	63	12,8

\* erhalten durch Extrapolation der Kinetik erster Ordnung aus Abb. 11 für  $t = 0$

† berechnet für den diffusionskontrollierten Austausch mit einer ungerührten Wassersphäre entsprechend der Größe der Zentralkapsel

$M_r$  : Molekularmasse des jeweiligen Zuckers.

Da der Zuckeraustritt aus den Zentralkapseln in das bewegte Medium offensichtlich membrankontrolliert ist, konnten Permeabilitätskoeffizienten auf der Basis der Volumen-Oberflächenverhältnisse (s. Tabelle 2) und der jeweiligen Geschwindigkeitskonstanten gemäß  $P = kV/A$  berechnet und in Tabelle 4 angegeben werden. Die Relation zwischen dem Permeabilitätskoeffizienten des Monosaccharids und demjenigen des Trisaccharids ist wesentlich größer als die Relation der Diffusionskoeffizienten in Wasser, die mit dem Kehrwert der Quadratwurzel der Molmasse abnimmt (Tabelle 4). Dies kann als Hinweis auf die direkte Behinderung der Diffusion in der Sporopolleninmatrix gedeutet werden. Offensichtlich ist die Permeabilitätsbegrenzung für die Zucker nicht allein durch einen geringen Flächenanteil unselektiver, wassergefüllter Poren zu erklären.

Da Pollen der Waldkiefer in größerer Menge zur Verfügung stand, wurden die meisten Versuche mit diesen durchgeführt und nur einzelne Versuche mit *P. nigra* verglichen. Dabei hatte die Exinepräparation der zuletzt genannten, im Vergleich zu *P. sylvestris*, einen mehr als doppelt so hohen Permeabilitätskoeffizienten; dieser Unterschied zeigte sich auch bei anderen Untersuchungen (vgl. Dextranmethode), ein artspezifischer Unterschied ist aber nicht gesichert, da von jeder Spezies nur eine Präparation untersucht wurde.

Um die Größenausschlussgrenze der Zentralkapsel für Makromoleküle zu analysieren, wurden die bisher bereits eingesetzten Verfahren zur Analyse der Größenausschlussgrenze von Zellwänden mit polydispersen Dextranlösungen [Woehlecke und Ehwald, 1995; Dautzenberg et al., 1999] eingesetzt und so an die Fragestellung angepasst, dass auch Permeabilitäten von Größenfraktionen unterhalb der Größenausschlussgrenze bestimmt werden konnten (s. 3.5). Das Verfahren besteht darin, dass man eine Dextran-Mischung aus zahlreichen Molekülgrößenfraktionen durch die Exine permeieren lässt und anschließend das Permeat mit Hilfe von Größenausschlusschromatographie analysiert und mit der Ausgangslösung vergleicht.

Die Sporopolleninkapseln wurden in der polydispersen Dextranlösung (s. Tabelle 1, S. 21) für 10 d äquilibriert, gefiltert und danach für bestimmte Zeiten in Pufferlösungen inkubiert, um das aus den Kapseln ausgetretene Permeat zu gewinnen. In der so gewonnenen Lösung sind die permeablen Dextranfraktionen stärker vertreten als die impermeablen, welche nur aus dem Oberflächenfilm und durch Adhäsion in den Sacci in das Permeat überführt wurden. Um diese impermeablen Anteile im Permeat zu quantifizieren enthielt die Ausgangslösung Dextran T70, das bei der für die Größenausschlusschromatographie verwendeten Superdex-Säule als Peak im Leervolumen eluiert wird (Abb. 13 A, Kurve c). Außerdem enthielt die Dextran-Ausgangslösung das Monosaccharid α-Methylglucosid, das in wenigen Minuten mit der Zentralkapsel äquilibriert und daher verglichen mit Dextran T70 im Permeat überrepräsentiert ist. Um den Transport durch die Kapselmembran für jede Größenfraktion zu erfassen, wurden die beiden Elugramme (Abb. 13 A, Kurve c und c') miteinander verrechnet, so dass für jede Größenfraktion ein Konzentrationsverhältnis  $q = c/c'$  ermittelt wurde; vgl. [Woehlecke und Ehwald, 1995]. Die Abhängigkeit dieses Verhältnisses vom Stokes'schen Radius (Abb. 13 B) ergab sich unter Berücksichtigung der zuvor durchgeführten Kalibrierung



der Säule mit Proteinstandards. Das Maximum dieses Verhältnisses liegt bei den permeablen Stoffen, die sowohl während der Inkubationszeit in der Dextranlösung als auch bei der Bildung des Permeates in der Pufferlösung ein Diffusionsgleichgewicht mit der Zentralkapsel erreichten. Das Minimum wird bei den Stoffen gefunden, die bereits während der Inkubation vollkommen von der Zentralkapsel ausgeschlossen blieben. Für langsam permeierende Stoffe, bei denen das Gleichgewicht während der Efflux-Periode (maximal 9 h) nicht vollständig erreicht wurde, ergibt sich ein Zwischenwert, aus dem eine Austauschrate  $\gamma$  (der Anteil, der Größenfraktion, der aus der Zentralkapsel in das Permeat übergetreten ist) für die jeweilige Efflux-Periode bestimmt werden konnte. Wird die Austauschzeit verlängert, so nimmt der Quotient für die langsam permeierenden Dextranfraktionen ab und der q-Graph zeigt die Permeation auch größerer Dextranfraktionen an. Bei längeren Diffusionszeiten erreichen auch größere Moleküle eine hohe Austauschrate (Abb. 13 B); dabei entsprechen den bestimmten Austauschraten  $\gamma$  (0,33; 0,50 und 0,66) definierte Molekülgrößenfraktionen.

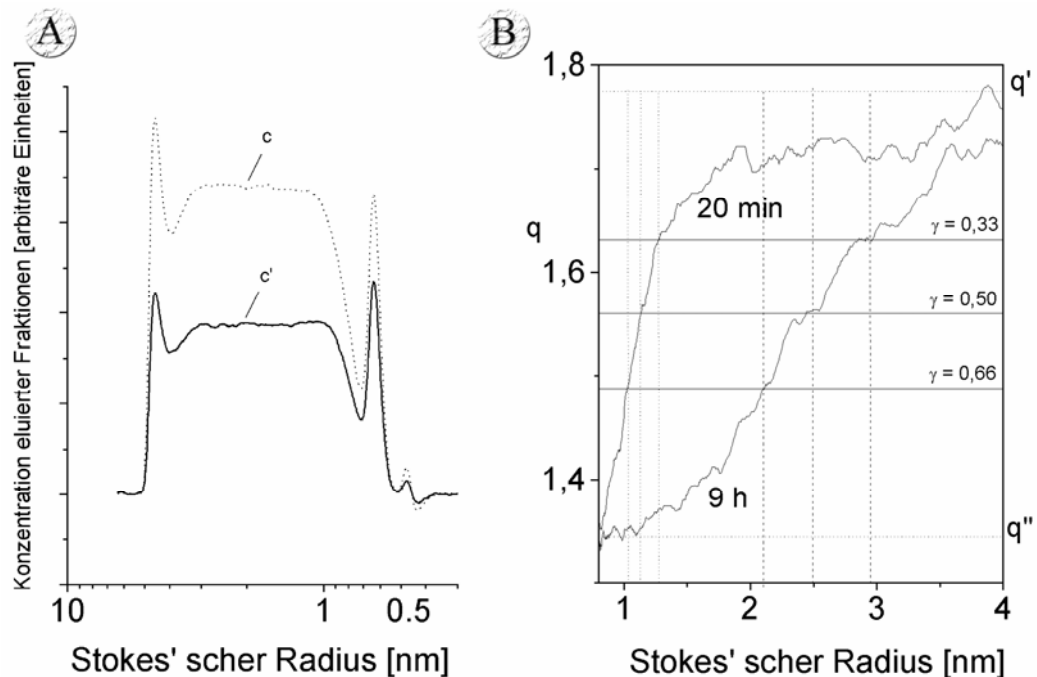


Abb. 13: Zeitabhängige Fraktionierung an Sporopolleninkapseln von optisch aktiven, polydispersen Dextran- und Zuckerlösungen. Größenausschlusschromatographisch erzeugte Elugraphen (A) der polydispersen Dextran-Beprobungslösung (DPS) in ihrem originären Zustand (c) und nach 20 min Efflux (c') aus filtrierten, zuvor mit DPS beladenen Sporopolleninkapseln (*P. sylvestris*), in eine Pufferlösung; die Diffusionszeit ist durch geeignete Kalibrierung in Stokes' sche Radien transformiert. Rechts (B) ist der Austauschquotient  $q = c / c'$  für den Efflux nach zwei Zeitintervallen (20 min und 9 h) gegen den Stokes' schen Radius aufgetragen. Das Maximum  $q'$  (impermeable Fraktion) wurde aus den Peaks von Dextran T70 an dem Leervolumen der Säule (Superdex HR75, 30 X 1 cm, Pharmacia) erhalten, das Minimum  $q''$  (vollständig ausgetauschte Fraktion) wurde aus den  $\alpha$ -Methylglucosid-Peaks erhalten; je Elugraph sind drei Austauschraten  $\gamma$  bestimmt (punktuelle Linie).

Die Geschwindigkeitskonstante  $k$  für den membrankontrollierten Diffusionsausgleich (vgl. 4.1.1.3) zwischen der Kapsel und dem Permeat ergibt sich bei einer bestimmten Diffusionszeit  $t$ :

$$k = -\ln(1 - \gamma)/t \quad (6)$$

Sie wurde für die in Abb. 13 B skizzierten Niveaus der Austauschrate  $\gamma$  berechnet und den entsprechenden Stokes' schen Radien zugeordnet (Tabelle 5).

Tabelle 5: Permeabilitätskoeffizienten von verschiedenen großen Dextranmolekülen, denen gemäß definierter Austauschraten und nach Ablauf bestimmter Diffusionszeiten Stokes' sche Radien zugeordnet sind († von Graphen vom Typ der Abb. 13 B abgelesen). Die Werte betreffen die Durchlässigkeit der Zentralkapsel von Exinen der Kiefer (*P. sylvestris* L.)

Diffusionszeit [min]	20			60			180			720		
Austauschrate $\gamma$	0,66	0,50	0,33	0,66	0,50	0,33	0,66	0,50	0,33	0,66	0,50	0,33
Geschwindigkeitskonstante * $k [s^{-1} \cdot 10^{-3}]$	0,90	0,58	0,33	0,30	0,19	0,11	0,10	0,06	0,04	0,03	0,02	0,01
Permeabilitätskoeffizient * [nm s <sup>-1</sup> ]	4,50	2,89	1,67	1,50	0,96	0,56	0,50	0,32	0,19	0,17	0,11	0,06
Stokes' scher Radius <sup>†</sup> [nm]	1,05	1,15	1,30	1,35	1,58	1,83	1,60	1,95	2,20	2,13	2,50	2,95

\* Berechnung basiert auf Austauschrate und Diffusionszeit und ist im Text erklärt.

Nach einigen Stunden zeigten Dextranmoleküle mit  $r_s$  zwischen 1,0 und 2,5 nm kleine, aber messbare Permeabilitätskoeffizienten. Sie erreichten nach spätestens drei Tagen ihr Gleichgewicht (Ergebnisse nicht dargestellt).

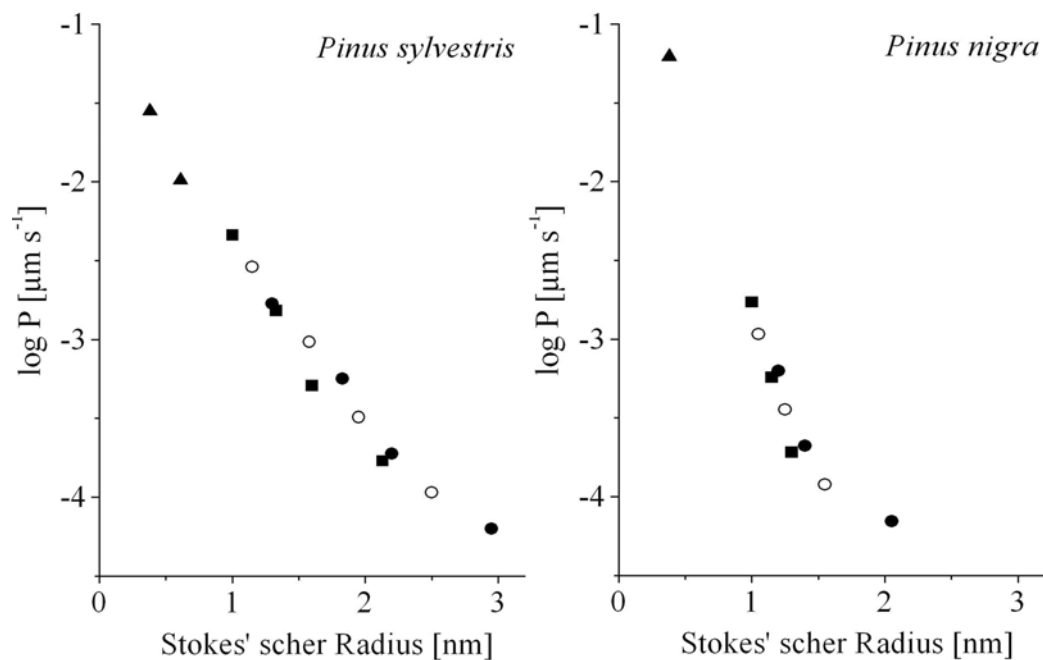


Abb. 14: Abhängigkeit des Permeabilitätskoeffizienten (P) von dem Stokes' schen Radius der Zucker und Dextranfraktionen, welche aus vorbeladenen Sporopolleninkapseln der Kiefer abgegeben werden. Zur Verdeutlichung des Wertebereichs ist P logarithmisch angegeben. Messwerte mit gleichem Symbol stehen für Werte, die bei derselben Austauschrate  $\gamma$  (● 0,33; ○ 0,50; ■ 0,66) nach verschieden langen Diffusionszeiten (vgl. Abb. 13 B, Werte aus Tabelle 5) erhalten wurden. ▲ geben P für  $\alpha$ -Methylglucosid und Raffinose, basierend auf Effluxkinetiken (vgl. Abb. 11 A, B) an.

Noch nach 20 min Diffusionszeit waren Dextranfraktionen mit  $r_s > 1,5$  nm kaum aus der Zentralkapsel ausgetreten. Größenfraktionen  $> 2,5$  nm permeierten zu langsam, als dass deren Permeabilität

mit genügender Genauigkeit in der vorgegebenen Versuchszeit bestimmt werden konnte. Für Dextrangemische konnten, je untersuchter Austauschrate  $\gamma$ , für jede gemessene Diffusionszeit drei Werte für  $r_s$  erhalten werden (Abb. 13) und die daraus berechneten Permeabilitätskoeffizient ( $P$ ) in Abb. 14 zusammengeführt werden. Die halb-logarithmische Auftragung gegen den Stokes' schen Radius für *P. sylvestris* von 0,6 bis 2,0 nm, für *P. nigra* von 0,6 bis 1,5 nm entspricht annähernd einer Geraden. Da die Kurven einheitlich sind, obwohl sie aus den Diffusionszeiten für drei verschiedene Austauschraten (0,33, 0,50 und 0,66) resultieren, kann gefolgert werden, dass das kinetische Modell (Austauschkinetik 1. Ordnung) realistisch ist und die untersuchten Kapseln hinsichtlich ihrer Permeabilität einheitlich waren. Wenn die Kapseln sich stark in der Permeabilität unterschieden, käme es bei dem höchsten Austauschquotient (= geringste  $\gamma$ ) zu signifikant höheren Werten für  $P$  (Tabelle 5).

#### 4.1.1.4 Permeabilitätskoeffizienten von niedermolekularen Substanzen an der Zentralkapsel (Nexine) von gepackten Sporopolleninkapseln anhand der kinetischen Peakverbreiterung

Die Diffusion von der Alkohole und anderer kleiner Moleküle oder Ionen durch die unverletzte Exine der Zentralkapsel erfolgt so schnell, dass sie mit Hilfe der bisher beschriebenen Methoden, die auf der Abtrennung des Mediums durch Filtration beruhen, nicht verfolgt werden kann. Um die Permeabilität für diese Stoffe messen zu können, wurde ein Verfahren eingesetzt, das aus der kinetischen Theorie der Verteilungs- und Ausschlusschromatographie folgt [Ehwald et al., 2002b]. Voraussetzung hierfür sind homogene, gut gepackte Säulen, die mit hohen Flussraten durchströmt werden können. Wässrige Suspensionen von Sporopolleninkapseln wurden bei einer Flussrate von 2 mL min<sup>-1</sup> in HPLC-Säulen (1 x 30 cm) gepackt (Abb. 15).

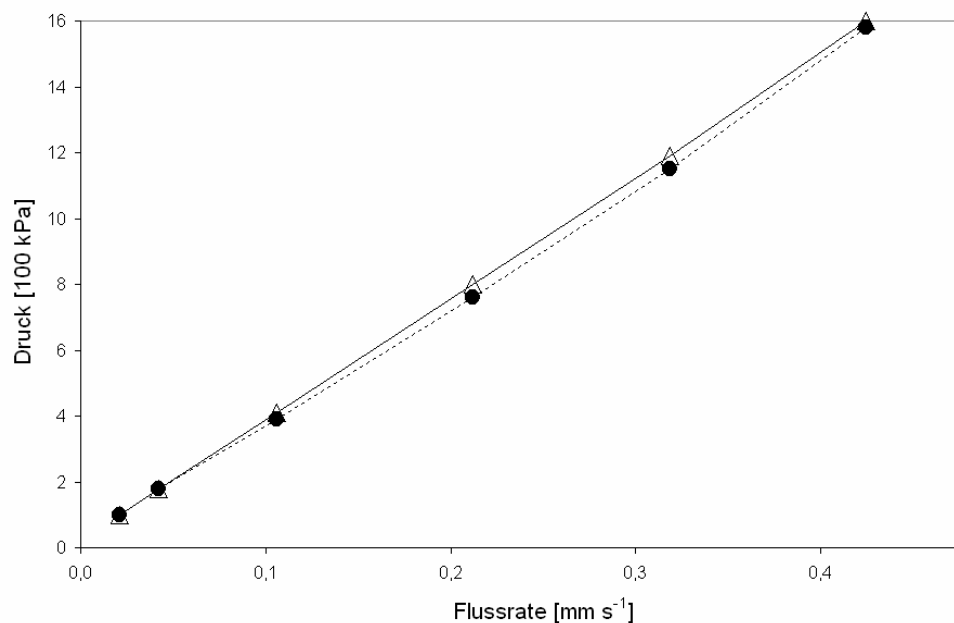


Abb. 15: Hysteresis der Flussratenabhängigkeit des Druck von Festbetten aus Sporopolleninkapseln in Phosphatpuffer. Für die Messung wurde die Flussrate zuerst gesteigert (●) und nach Erreichen des Maximalwerts wieder gemindert (Δ). Die Kapseln (*P. sylvestris*) lassen sich zu druckresistenten Festbetten in eine Leersäule (Pharmacia HR10/30, 1 x 30 cm) packen.

Das Volumen der erhaltenen Festbetten (ca. 23,5 ± 0,16 mL) aus den Kapseln von *P. sylvestris* blieb bei Flussraten bis ca. 25 mm min<sup>-1</sup> (2 mL min<sup>-1</sup>) weitestgehend konstant. Dabei nahm der resultierende Druck in der Packung annähernd linear mit der Flussrate zu. Das Festbett zeigt demnach eine annähernd konstante hydraulische Leitfähigkeit bis 15 kPa. Wenn die Flussrate  $v$  über ca. 0,5 mm s<sup>-1</sup> (> 16 kPa) gesteigert wurde, sackte die Packung ab und wurde verdichtet. Dies war wesentlich stärker in Ethanol als in Wasser der Fall (Ergebnisse nicht dargestellt, [Lerche et al.,

2002]). Eine anschließende Minderung der Flussrate (Abb. 15) führte, bei gleicher Flussrate, zu höheren Drücken als bei Steigerung der Flussrate (Hysteresis auf Grund irreversibler Verdichtung). Packungen triporater Sporopolleninkapseln der Birke waren trotz einer geringeren Partikelgröße etwas leichter durchströmbar als die Packungen der inaperturaten Exine von *Pinus* (Ergebnisse nicht dargestellt).

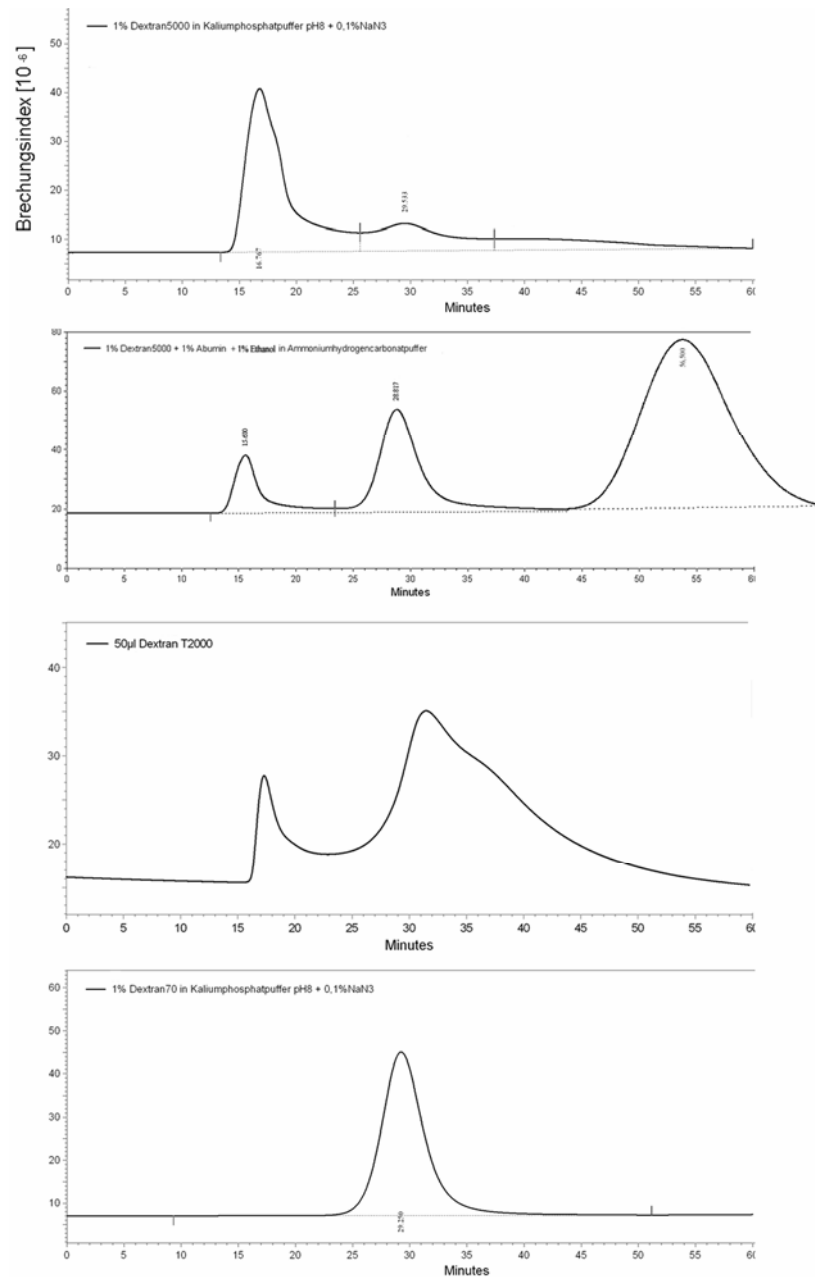


Abb. 16: Elution von polymeren Dextranen unterschiedlicher Molekülmasse, einem Dextran-Albumin-Gemisch und Ethanol an gepackten Sporopolleninkapseln der Kiefer. Dextran T5000 ( $M_r = 5000 \text{ kg mol}^{-1}$ ) wird von nahezu allen Kapselräumen ausgeschlossen (Ausschlussvolumen = Interpartikelvolumen) und hat bei  $t_e = \text{ca. } 17,6 \text{ min}$  das Elutionsmaximum (oberstes Elugramm, 1. Peak; vgl. Tabelle 6). Albumin eluiert als zweiter Peak ( $t_e = \text{ca. } 29 \text{ min}$ ) und tauscht auch mit dem Volumen der Luftsäcke aus; Ethanol eluiert als dritter Peak ( $t_e = 56 \text{ min}$ ). Dextran T2000 ( $M_r = 2000 \text{ kg mol}^{-1}$ ,  $r_s = \text{ca. } 40 \text{ nm}$ ) wird teilweise ausgeschlossen (Interpartikelvolumen); der andere Teil eluiert als zweiter Peak ( $t_e = \text{ca. } 33 \text{ min}$ ) entsprechend dem Volumen der Sacci. Dextran T70 ( $M_r = 70 \text{ kg mol}^{-1}$ ,  $r_s = 4,56 \text{ nm}$ ) tauscht, wie Albumin, mit den Luftsäcken aus. Für eine scharfe bzw. vollständige Trennung der Molekülgrößenfraktionen von T70 war die Flussrate ( $0,5 \text{ mL min}^{-1}$ ) zu hoch (asymmetrische Peaks). Probenvolumen  $50 \text{ µL}$ ,  $c = 10 \text{ g L}^{-1}$  Eluent (Phosphatpuffer), 100 % Festbettvolumen (23,7-25,9 mL) in Leersäule (HR10/30,  $1 \times 30 \text{ cm}$ ); die Detektion erfolgte refraktometrisch (RI-ERC7512); Kapseln (*P. sylvestris*).

Hochmolekulare und niedermolekulare Stoffe wurden von den Säulen in Form von Peaks mit molekülgrößenabhängiger Elutionszeit eluiert, wobei das relative Elutionsvolumen von der Flussrate unabhängig war. Interessanterweise wurden Proteine und besonders hochmolekulare Stoffe als besonders scharfe Peaks eluiert (Abb. 16, Abb. 17).

Tabelle 6: Relatives Elutionsvolumen von polymeren Dextranlösungen an gepackten Sporopolleninkapseln bei unterschiedlichen Flussraten. Die zuerst eluierte Größenfraktion (Peak 1) wird von allen Kapselräumen ausgeschlossen und entspricht dem Interpartikelvolumen. Die im zweiten Peak eluierte Fraktion tauscht neben dem Interpartikelvolumen auch mit dem Volumen der Sacci aus. Probenvolumen 50 µL,  $c = 10 \text{ g L}^{-1}$ ; Eluent Standard-Phosphatpuffer, 100 % Festbettvolumen 22,3-22,7 mL (Leersäule HR10/30, 1 x 30 cm), refraktometrische Detektion (RI-ERC7512.), Kapseln (*P. sylvestris*)

Dextran	Flussrate [mm s <sup>-1</sup> ]	Elutionsvolumen [% Säulenvolumen]	
		Peak 1	Peak 2
T5000	0,04	38,6	64,2
	0,10	38,2	64,3
	0,11	38,4	64,3
T2000	0,04	39,1	64,1
	0,10	38,9	63,6
	0,11	39,1	63,6
T70	0,05	--	67,0
	0,11	--	66,9
	0,16	--	65,8
	0,21	--	66,5

Die Elutionszeit  $t_e$  des Peakmaximums von Dextran T5000 entsprach einem relativen Elutionsvolumen  $V_e$  von 38,2 % (Tabelle 6, vgl Abb. 16). Das Elutionsvolumen der ausgeschlossenen Polymere, das dem Produkt aus der Elutionszeit und der Volumenflussrate entspricht, wurde auf die Summe aus dem Bettvolumen und dem Totvolumen (Volumen der Säulenzu- und ableitung) bezogen, um so den Volumenanteil des Interpartikelraumes zu berechnen:

$$V_{\text{Interpartikelraum}} = \frac{t_{e(\text{DexT5000})} V}{V_e + V_{\text{tot}}} \quad (7)$$

Es betrug 38-39 %. Für die Bestimmung des Volumens der Sacci wird das bereinigte Elutionsvolumen eines Proteins (Abb. 17), des Dextran T70 (Abb. 16) oder eines jeden anderen Stoffes, der mit dem Volumen der Luftsäcke austauscht, auf das Gesamtvolumen bezogen und davon das oben bestimmte Interpartikelvolumen subtrahiert. Das Volumen der paarigen Sacci betrug 24-26 % des Bettvolumens. Gelöste niedermolekulare Stoffe äquilibrierten mit der gesamten stationären Flüssigphase, die sich hauptsächlich aus dem Interpartikelraum, den Sacci und dem Lumen der Zentralkapseln ergibt. Da das Porenvolumen in der wassergesättigten Sporopolleninmatrix nur etwa  $0,2 \text{ mL g}^{-1} \text{ TM}$  (Tabelle 12, S. 48) beträgt und der Masseanteil des Feststoffes in der Packung 6-7 % ausmacht, kann das Porenvolumen nur etwa 2 % des Bettvolumens ausfüllen und hat daher keinen nennenswerten Einfluss auf das Elutionsvolumen. Der Volumenanteil der Zentralkapseln entspricht daher in guter Näherung der Differenz des relativen Elutionsvolumens der niedermolekularen Stoffe, die in die Zentralkapsel permeieren, und von Dextran T70, bezogen auf das Gesamtvolumen ( $V_e + V_{\text{tot}}$ ):

$$V_{\text{Zentralkapsel}} = \frac{t_{e(\text{Zucker})} V}{V_e + V_{\text{tot}}} - \frac{t_{e(\text{DexT70})} V}{V_e + V_{\text{tot}}} \quad (8)$$

Das Volumen der Zentralkapsel betrug 27-31 % und war damit etwas größer als das der paarigen

Sacci. Ein stets vorhandener kleiner Anteil von mechanisch verletzten Zentralkapseln bzw. Sacci wird bei diesem Verfahren als Interpartikelraum erfasst.

Während das relative Elutionsvolumen von der Flussrate unabhängig war, nahm die Peakbreite mit Anstieg der Flussrate zu. Dies galt insbesondere für die niedermolekularen Stoffe, deren Austausch an der Zentralkapsel kontrolliert wird, in geringerem Maße aber auch für Proteine und Dextrane, die nicht mit der Zentralkapsel austauschen.

Die Peakvarianz  $\sigma^2$ , d.h. das Quadrat der halben Peakbreite bezogen auf das Elutionsvolumen (vgl. Abb. 17) wurde für jeden Lauf bei 60,7 % der Höhe des Peakmaximums bestimmt und in das Höhenäquivalent einer theoretischen Trennstufe ( $H$ ) transformiert:

$$H = \frac{\sigma^2}{V_e^2} L \quad (9)$$

dabei ist  $L$  die Länge der aus Kapseln gepackten Festbetten und  $V_e$  das Elutionsvolumen zum Zeitpunkt des Peakmaximums. Die Trennstufenanzahl oder Bodenzahl  $N$  ergibt sich entsprechend:

$$N = \frac{V_e^2}{\sigma^2} \quad (10)$$

Daher bot sich die Möglichkeit, die Kinetik des Diffusionsaustausches quantitativ mit Hilfe der Theorie der Austauschkinetik bei der Verteilungs- und Ausschlusschromatographie [Giddings, 1965] zu behandeln; diese Theorie gilt sowohl für die Austauschkinetik niedermolekularer Teilchen durch die Exine der Zentralkapsel als auch für die von Polymeren an der die Luftsäcke begrenzenden Sexine. Voraussetzungen hierfür sind, dass die rein strömungsbedingte Peakverbreiterung (Kanaldispersion) und die Peakverbreiterung durch Axialdiffusion vernachlässigbar sind. Die Kanaldispersion ist vom Austausch mit der stationären Flüssigphase unabhängig.

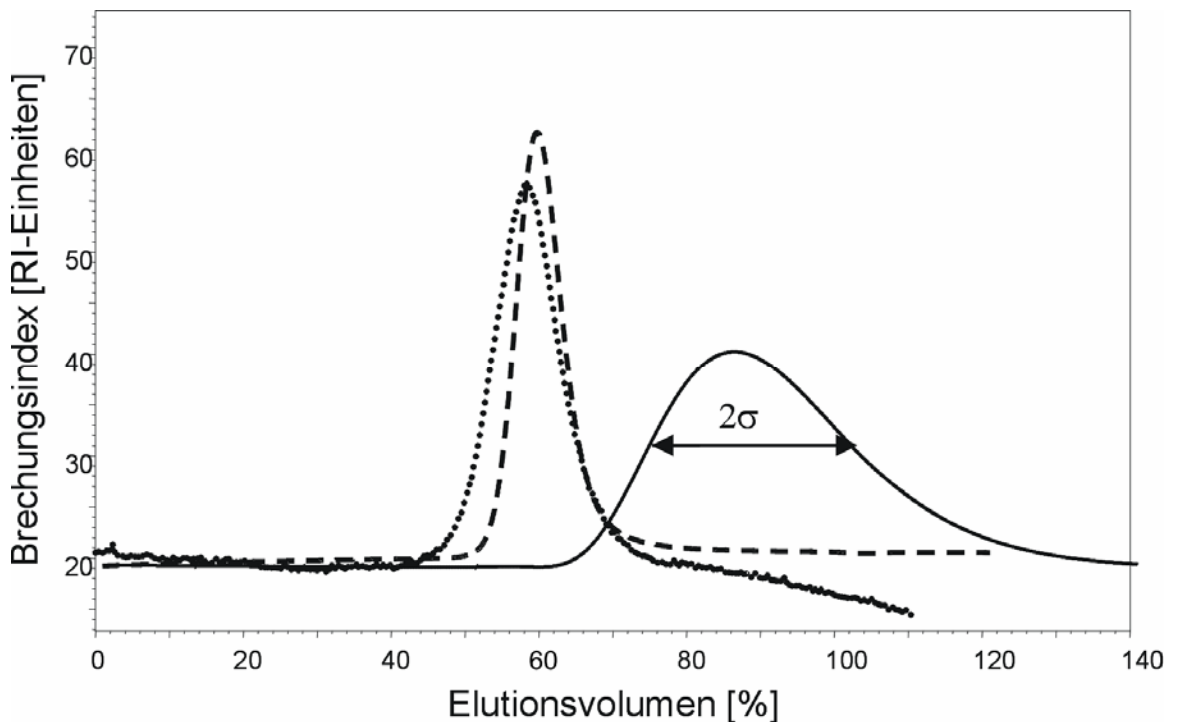


Abb. 17: Elution von Proteinen und niedermolekularen Stoffen aus einem Festbett von gepackten Sporopolleninkapseln. Refraktometrische Detektion von Immunglobulin (IG, 900 kDa, punktiert), Human Serum Albumin (HSA, 69 kDa, gestrichelt) und Alanin (AS, 88 Da, durchgezogene Linie). Proteine tauschen schnell mit den Luftsäcken, Alanin tauscht langsam mit der Zentralkapsel aus, dabei ist  $2\sigma$  die Peakbreite bei 60,7 % der Peakhöhe; Probenvolumen 50  $\mu$ L, 100 % Festbettvolumen = 24,8 mL, Kapseln (*P. sylvestris*), Leersäule (HR10/30, 1 x 30 cm); bei einer Flussrate von 0,5 mL  $\text{min}^{-1}$  lastete ein Druck von 3 hPa auf dem Festbett.

Falls sie bei den untersuchten Fließgeschwindigkeiten bedeutsam wäre, müssten auch die ausgeschlossenen Moleküle eine merkliche Zunahme der Peakbreite ( $2\sigma$ , Abb. 17) mit der Fließgeschwindigkeit zeigen. Dies ist jedoch nicht der Fall (Woehlecke, persönliche Mitteilung). Nur wenn auch die zweite Voraussetzung in guter Näherung erfüllt ist (ausreichend große Flussraten zur Minimierung der Axialdiffusion), ergibt sich eine lineare Abhängigkeit der Trennstufenhöhe  $H$  bzw. der Peakvarianz  $\sigma^2$  von der Fließgeschwindigkeit  $v$ . Da in allen Fällen eine solche lineare Abhängigkeit gefunden wurde (Abb. 18), ist die folgende Gleichung von J. C. Giddings [1965],

$$k = 2 \frac{dv}{dH} R(1 - R) \quad (11)$$

welche sich auf den verzögerten Austausch mit der stationären Phase beschränkt, ausreichend, um die Abhängigkeit der Trennstufenhöhe von der Fließgeschwindigkeit zu analysieren; hierin ist  $k$  die Geschwindigkeitskonstante und  $R$  der Retentionsfaktor.  $R$  das Verhältnis zwischen dem relativen Elutionsvolumen (REV) der nicht permeierenden und dem der permeierenden Bestandteile der Probe.

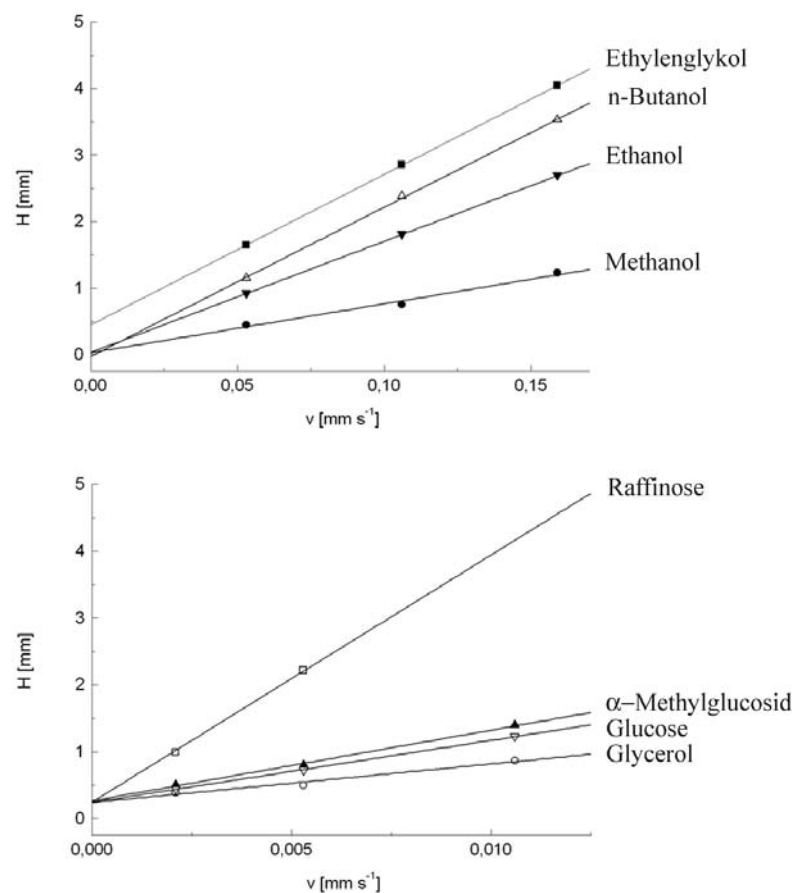


Abb. 18: Abhängigkeit der Trennstufenhöhe von der Flussrate bei der Elution wässriger Lösungen von niedermolekularen Substanzen an gepackten Sporopolleninkapseln. Probenvolumen  $50\ \mu\text{L}$ ,  $c = 10\ \text{g L}^{-1}$ ; Festbettvolumen =  $24,5\ \text{mL}$ , Kapseln (*P. sylvestris*);  $dH/dv$  wurde durch linearen Regression mit  $R^2 > 0,9$  erhalten und ist in Tabelle 8 und Tabelle 9 angegeben.

Wird der Austausch mit den Sacci betrachtet, ist  $R$  das Verhältnis aus dem REV von Dextran T5000 und dem REV der in die Sacci permeierenden Proteine oder des Dextrans T70, dessen  $k$  ihres Austauschs mit den Sacci erfasst werden soll. Wird der Austausch von gelösten Stoffen geringer Molekülgröße der Zentralkapsel betrachtet, ist  $R$  das Verhältnis aus dem REV für Proteine

oder Dextran T70, die von der Zentralkapsel ausgeschlossen bleiben und dem REV der niedermolekularen Stoffe, die hinein diffundieren. Für Proteine und Dextran T70 betrug  $R = 0,59-0,60$  (Sacci) und für niedermolekulare Stoffe 0,66 bis 0,67 (Zentralkapsel).

Bei linearen Flussraten zwischen  $2$  und  $160 \mu\text{m s}^{-1}$  ( $0,01-0,75 \text{ mL min}^{-1}$ ) konnte für alle untersuchten niedermolekularen Substanzen die Linearität der Beziehung zwischen der Peakvarianz ( $\sigma^2$ ) bzw. der Trennstufenhöhe  $H$  und der Flussrate  $v$  mit Korrelationskoeffizienten  $> 0,90$  gezeigt werden (Abb. 18), wobei für die langsam permeierenden Zucker sehr geringe, für die schnell permeierenden Alkohole wesentlich höhere Flussraten eingestellt werden mussten. Bei Zuckern, Aminosäuren und Salzen führten Flussraten über  $10 \mu\text{m s}^{-1}$  zu starker Asymmetrie, und noch höhere Flussraten ( $200 \mu\text{m s}^{-1}$ ) zu einer Verschiebung der Peaklage (Ergebnisse nicht dargestellt). Der vollständige Austausch der Zentralkapsel mit relativ großen Zuckern wie  $\alpha$ -Methylglucosid und vor allem Raffinose dauerte annähernd 10 respektive 45 Minuten (Abb. 11), so dass nur bei sehr niedrigen Flussraten die eluierten Peaks symmetrisch waren.

Dagegen zeigten sich deutliche Effekte auf die Peakvarianz bei Ethanol und Methanol erst bei sehr hohen Flussraten (Abb. 18, Tabelle 9 und Tabelle 7).

Um die Abhängigkeit der Trennstufenhöhe von der linearen Flussrate mit Hilfe der Gleichung (11) auszuwerten, wurde der Bereich der Fließgeschwindigkeit für die niedermolekularen Substanzen so gewählt, dass symmetrische Peaks entstanden, deren Elutionsvolumen dem gesamten Flüssigkeitsvolumen in der Säule nahe kam und von der Flussrate nicht signifikant beeinflusst war.

Das Elutionsvolumen der niedermolekularen, wasserlöslichen Stoffe entsprach nahezu dem gesamten Flüssigkeitsvolumen  $V_l$  abzüglich der Trockenmasse, welche mit etwa 6-7 % zu vernachlässigen ist. Die einzige der verwendeten Verbindungen, für die eine schwache Absorption im Feststoff Sporopollenin festgestellt wurde, war  $n$ -Butanol. Hier war das Elutionsvolumen etwas größer als das Bettvolumen. Dementsprechend ergab sich ein niedrigerer Wert für das Retentionsverhältnis  $R$  (Tabelle 8).

Der Austausch zwischen der stationären Phase (Lumen der Zentralkapsel) und der mobilen Phase ist offensichtlich membrankontrolliert (vgl. S. 30). Daher baut sich auch bei der Größenausschlusschromatographie der Konzentrationsgradient  $\Delta C$  zwischen der mobilen Phase (außerhalb der Zentralkapsel) und der stationären Phase (in der Zentralkapsel) mit einer Kinetik erster Ordnung ab:

$$-\frac{d\Delta C}{dt} = \Delta C_0 (1 - e^{-kt}) \quad (12)$$

Hierbei ist die Geschwindigkeitskonstante  $k$  dem Permeabilitätskoeffizienten  $P$  der Kapselmembran proportional ( $k = A / V P$ ). Da  $k$  entsprechend Gleichung ((11)) aus der linearen Abhängigkeit der Trennstufenhöhe von der Flussrate direkt zugänglich ist, bieten die Regressionen in Abb. 18 und das Verhältnis zwischen Oberfläche und Volumen  $A / V$  (Tabelle 2) die Grundlage für die Berechnung des Permeabilitätskoeffizienten der Zentralkapsel für niedermolekulare Stoffe und der Luftsäcke für höhermolekulare Stoffe.

Tabelle 7: Kinetische Peakverbreiterung ( $\Delta H / \Delta v$ ) bei der Elution von Dextran T70 an gepackten Sporopolleninkapseln in Abhängigkeit von der Flussrate. Die Peakbreite ( $\sigma$ ) am Elutionsmaximum ( $t_e$ ) liefert die Trennstufenzahl ( $N$ ). Aus der Abhängigkeit der Trennstufenhöhe ( $H$ ) von der Flussrate ( $v$ ), dem Retentionsfaktor ( $R$ ) und dem Volumen/Oberflächen-Verhältnis der Sacci =  $3 \mu\text{m}$ ) ergibt sich die Permeabilität ( $P$ ) der Sacci (Leersäule Pharmacia, HR10/30,  $1 \times 30 \text{ cm}$ ,  $V = 22,62 \text{ mL}$ ; Probenvolumen  $50 \mu\text{L}$ ,  $c = 10 \text{ g L}^{-1}$ , Kapseln ( $P. sylvestris$ ))

	$v$ [mm $\text{s}^{-1}$ ]	$t_e$ [min]	$V_e$ [% Säulen- volumen]	$\sigma$ [min]	$N =$ $(t/\sigma)^2$	$R$	$\Delta H/\Delta v$ [mm $\text{s}^{-1}$ ]	$P$ [ $\mu\text{m s}^{-1}$ ]
Dextran T70	0,053	61,38	67,05	3,2	378	0,59	4,64	0,313
	0,106	30,63	66,92	1,7	321	0,60		
	0,159	20,07	65,77	1,4	206	0,59		
	0,212	15,22	66,50	1,1	204	0,59		



Analog zur Permeabilität der Zentralkapsel für niedermolekulare Teilchen kann auch die Permeabilität der Luftsäcke für Polymere bestimmt werden (Tabelle 7), obwohl die kinetische Peakverbreiterung von Serumalbumin oder Dextran T70 relativ klein war. Für die Sacci beträgt das Verhältnis von Volumen zu Oberfläche etwa  $3 \mu\text{m}$  und der Retentionsfaktor  $R$  für Proteine und Dextranpolymere liegt bei 0,59-0,60. Aus dem geringen Anstieg der Trennstufenhöhe mit der Flussrate ergaben sich nach Gleichung ((11)) hohe Werte für die Geschwindigkeitskonstante  $k$  bzw. die Permeabilität der sacculen Sexine. Sie ist beispielsweise für Dextran T70, dessen Molekülgröße die vieler Proteine übersteigt, größer als  $0,31 \mu\text{m s}^{-1}$  (Tabelle 7).

Tabelle 8: Kinetische Peakverbreiterung ( $\Delta H/\Delta v$ ) bei der Elution von Alkanolen und Glucose an gepackten Sporopolleninkapseln in Abhängigkeit von der Flussrate. Die Peakbreite ( $\sigma$ ) am Elutionsmaximum ( $t_e$ ) liefert die Trennstufenzahl ( $N$ ). Retentionsfaktor ( $R$ ), die Abhängigkeit der Trennstufenhöhe ( $H$ ) von der Flussrate ( $v$ ) und das Volumen/Oberflächen-Verhältnis der Kapseln von  $5,01 \mu\text{m}$  (*P. sylvestris*,) ergibt die Permeabilität ( $P$ ) der Kapselexine. Dabei wurde Dextran T70 bei 67,3 % des Säulenvolumens (Leersäule Pharmacia, HR10/30,  $1 \times 30 \text{ cm}$ ,  $V = 24,43 \text{ mL}$ ) eluiert; Probenvolumen  $50 \mu\text{L}$ ,  $c = 10 \text{ g L}^{-1}$  in Phosphatpuffer

	$v$ [mm $\text{s}^{-1}$ ]	$t_e$ [min]	$V_e$ [% Säulen- volumen]	$\sigma$ [min]	$N =$ $(t/\sigma)^2$	$R$	$\Delta H/\Delta v$ [mm $\text{s}^{-1}$ ]	$P$ [ $\mu\text{m s}^{-1}$ ]
Methanol	0,053	94,2	95,4	3,6	697	0,65	7,37	0,309
	0,106	47,0	95,1	2,3	414	0,65		
	0,159	31,1	94,3	2,0	253	0,65		
Ethanol	0,053	95,8	97,0	5,2	339	0,64	16,71	0,137
	0,106	47,5	96,1	3,6	172	0,65		
	0,159	31,0	94,1	2,9	116	0,65		
n-Butanol	0,053	126,7	128,2	7,7	271	0,48	22,44	0,112
	0,106	63,1	127,8	5,5	131	0,49		
	0,159	41,6	126,3	4,4	88	0,48		
Ethylenglykol	0,053	91,8	92,9	6,7	189	0,67	22,65	0,097
	0,106	45,1	91,3	4,3	109	0,68		
	0,159	29,6	89,8	3,4	77	0,68		
Glucose	0,064	67,8	82,4	10,5	42	0,81	67,22	0,021
	0,106	38,7	78,3	7,0	30	0,85		

Weit stärker ist der Austausch der niedermolekularen Stoffe mit dem Lumen der Zentralkapsel durch den Permeationswiderstand der vollständigen Exine (einschließlich Abbauprodukte der Intine) verzögert. Hier ergeben sich aus dem Anstieg  $\Delta H/\Delta v$  weit geringere Permeabilitätskoeffizienten für die meisten der untersuchten Substanzen, mit Ausnahme des kleinsten der untersuchten Moleküle, des Methanols (Tabelle 8, Tabelle 9). Es wurde eine ausgeprägte Abhängigkeit des Permeabilitätskoeffizienten von der Molekülgröße selbst bei kleinsten Molekülen gefunden. Dabei fällt auf, dass Methanol im Vergleich zu Ethanol mehr als doppelt so schnell durch die Exine der Zentralkapsel permeiert, obwohl die Differenz ihrer Molekülmassen dies nicht erwarten ließ. Für Zucker konnten die Permeabilitätskoeffizienten der Zentralkapsel sowohl mit der hier dargestellten Methode an Hand der Peak-Varianzen (Tabelle 8, Tabelle 9) als auch anhand der Effluxkinetik (vgl. S. 30-32) unabhängig voneinander bestimmt werden.

Tabelle 9: Kinetische Peakverbreiterung ( $\Delta H/\Delta v$ ) bei der Elution von niedermolekularen Stoffen und Zuckern an gepackten Sporopolleninkapseln in Abhängigkeit von der Flussrate. Die Peakbreite ( $\sigma$ ) am Elutionsmaximum ( $t_e$ ) liefert die Trennstufenzahl (N). Retentionsfaktor (R), die Abhängigkeit der Trennstufenhöhe (H) von der Flussrate (v) und das Volumen/Oberflächen-Verhältnis der Kapseln (P. sylvestris, 5,01  $\mu\text{m}$ ) ergibt die Permeabilität (P) der Kapselexine. Dabei wurde Dextran T70 bei 67,3 % des Säulenvolumens (Leersäule Pharmacia, HR10/30, 1 x 30 cm, V = 23,09 bis 23,40 mL) eluiert. 50  $\mu\text{L}$  Probenvolumen, c = 10 g L<sup>-1</sup>

	v [mm s <sup>-1</sup> ]	t <sub>e</sub> [min]	V <sub>e</sub> [% Säulen- volumen]	$\sigma$ [min]	N = (t/ $\sigma$ ) <sup>2</sup>	R	$\Delta H/\Delta v$ [mm s <sup>-1</sup> ]	P [ $\mu\text{m}$ s <sup>-1</sup> ]
Alanin	0,027	180	90,9	13	186	0,73	39,5	0,048
	0,053	89	89,8	8	112	0,74		
	0,106	43	86,5	5	64	0,77		
Glycerol	0,002	2252	96,4	82	753	0,69	57,8	0,036
	0,005	873	93,4	36	591	0,71		
	0,011	434	92,9	24	338	0,72		
Glucose	0,002	2247	96,2	87	664	0,69	92,9	0,022
	0,005	868	92,9	43	406	0,72		
	0,011	429	91,7	28	239	0,73		
$\alpha$ -Methyl- glucosid	0,002	2234	95,6	92	585	0,70	106,0	0,019
	0,005	866	92,7	45	368	0,72		
	0,011	429	91,9	30	211	0,72		
Raffinose	0,002	2213	94,7	128	298	0,70	386,5	0,006
	0,005	839	89,8	73	133	0,74		

Die Übereinstimmung war sehr gut. Insgesamt ergibt sich unter Einbeziehung der Daten zur Langzeitpermeation von kleineren Dextranfraktionen (s. S. 33-34) eine Molekülgrößenabhängigkeit der Permeabilitätskoeffizienten über einen Wertebereich von mehreren Größenordnungen, die Schlussfolgerungen über die Porenverteilung in den untersuchten Sporopolleninmembranen zulässt (vergl. Diskussion 5.1.2, S. 66).

Die Permeabilitätskoeffizienten hängen über das Verhältnis von Volumen/Oberfläche mit der Halbwertszeit des Diffusionsausgleiches ( $\tau$ ) zusammen. Für Methanol und Ethanol ist  $\tau$  gleich 11 resp. 25 Sekunden. Sie liegen um etwa drei Größenordnungen über den Halbwertszeiten, die sich für den Austausch der Alkohole mit einer ungerührten Wasserzone von der Größe der Zentralkapsel errechnen lassen (vgl. Tabelle 4, S. 32). Auch für diese kleinen Moleküle ist der Austausch daher strikt membrankontrolliert.

#### 4.1.2 Weitere physiko-chemische Eigenschaften des Sporopollenins

##### 4.1.2.1 Adhäsion von Wasser, Alkanolen und n-Heptan

Wenn reife Kiefernpollen oder daraus präparierte Sporopolleninkapseln in Emulsionen von Wasser und n-Heptan oder Wasser und Butanol suspendiert wurden, sedimentierten diese in die wässrige Phase bzw. in die konvexe Phasengrenze; das gleiche Ergebnis wurde auch für Exinen von *Betula* und *Alnus* erhalten. Quollen lyophilisierte Sporopolleninkapseln in reinem Butanol, Pentanol oder n-Heptan und wurde diese Suspension anschließend mit dem zweifachen Volumen einer wässrigen Suspension von Chinesischer Tusche geschüttelt, so verteilten sich alle Kapseln in der wässrigen Phase (Abb. 19) oder sie waren wenigstens, insbesondere in der n-Heptan-Wasser-Dispersion, von einem dünnen Wasserfilm umgeben; Kapseln, die zum Quellen in Wasser gebracht und danach in die organisch-wässrige Dispersion überführt wurden, blieben in der Wasserphase. Keine

der Kapseln war vollständig von der organischen Phase umgeben, auch wenn sie in derselben vor-gequellt wurden.

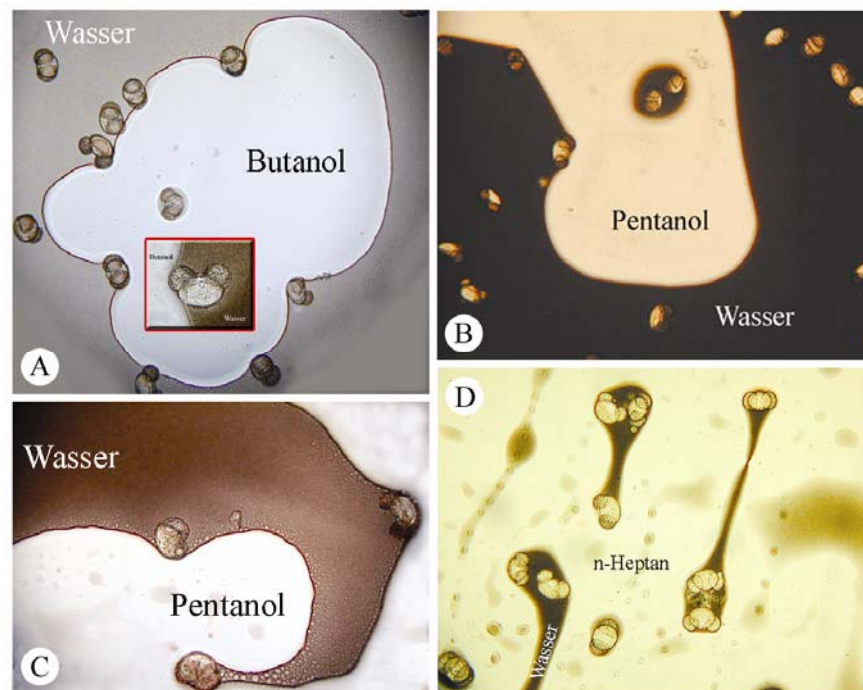


Abb. 19: Verteilung von lyophilisierten Sporopolleninkapseln in wässrigen Emulsionen mit Butanol, Pentanol und n-Heptan. Die Kapseln (*P. sylvestris*) wurden in 0,5 mL Butanol (A), tuschegefärbtem Wasser (B), Pentanol (C) oder n-Heptan (D) gequellt und mit 1 mL Pentanol (B) oder 1 mL tuschegefärbtem Wasser gemischt. Alle Kapseln sind von schwarzgefärbtem Wasser (Chinesische Tusche) bzw. eines Films desselben (D) umgeben.

Um die Benetzungskräfte zwischen verschiedenen Flüssigkeiten und dem Sporopollenin quantitativ vergleichen zu können, wurden die lyophilisierten Sporopolleninkapseln mit verschiedenen Flüssigkeiten (Wasser, Ethanol und n-Heptan) in kleinen Säulen zu einem Partikelbett gepackt und die kritische Druckdifferenz ermittelt, welche das Eindringen von Luft in die engen Zwischenräume zwischen den Kapseln und das Ausfließen der jeweiligen Flüssigkeit aus den Partikelbetten bewirkte.

Tabelle 10: Kritische Druckdifferenz für den Eintritt von Luft in den Interpartikelraum von flüssigkeitsgesättigten Betten gepackter Sporopolleninkapseln. Kapseln (*P. nigra*) wurden als Nassbetten (Höhe 25 mm, Durchmesser 7 mm) in Glassäulen gepackt und abnehmendem Luftdruck (Saugspannung) an der unteren Öffnung oder zunehmendem Luftdruck (Kompression) an der oberen Öffnung solange ausgesetzt, bis die kritische Druckdifferenz erreicht war und die mobile Flüssigphase auslief

	Oberflächenspannung $\sigma$ gegen Luft bei 20 °C [mN m <sup>-1</sup> ]	Kritische Druckdifferenz [10 <sup>2</sup> Pa] <sup>*</sup>	
		Saugspannung	Kompression
Deionisiertes Wasser	72,6	-80 ± 11	93 ± 13
Ethanol	22,8	-82 ± 19	139 ± 4
n-Heptan	19,7	-19 ± 3	27 ± 8

\* Mittelwerte ± Standardabweichung

Alle untersuchten Flüssigkeiten wurden spontan gegen die Schwerkraft von Packungen getrockne-

ter Kapseln eingesaugt. Ein Ausfluss von Ethanol oder Wasser aus den Interpartikelräumen erfolgte erst dann, wenn der Luftdruckunterschied annähernd 10 kPa betrug (Tabelle 10). Im Gegensatz dazu adhierte n-Heptan mit weit geringerer Kraft in der Packung. Die kritische Druckdifferenz war beim Saugen etwas kleiner als bei der Anwendung von Überdruck (Tabelle 10). Unter der Voraussetzung gleicher Porenradien bzw. Packungsdichten (s. Abb. 15 und [Woehlecke et al., 2002]) ergibt sich in einem Kapillarsystem wie der verwendeten Trockenpackung der Gleichgewichtsdruck  $P$  nach dem Laplaceschen Gesetz und der barometrischen Höhenformel ([Atkins, 1990], S. 158-161):

$$P = \frac{2\sigma \cos \gamma}{gr} \quad (13)$$

Hierin bedeuten  $\sigma$  die Oberflächenspannung der Flüssigkeit,  $\gamma$  der Grenzwinkel der Feststoffbenetzung der Flüssigkeit in Luft,  $g$  die Gravitationsbeschleunigung und  $r$  der Innenradius der Kapillare.

Ethanol und Wasser benetzen eine gereinigte Glasoberfläche vollständig, der Kontaktwinkel beträgt  $0^\circ$ . Für einen quantitativen Vergleich der Benetzbarkeit von Wasser und Ethanol an gepackten Sporopolleninkapseln kann die kritischen Druckdifferenz ( $\Delta P$ ), die nötig ist, dass Luft in den flüssigkeitsgefüllten Interpartikelraum der Festbetten eindringt, genutzt werden um den Kapillardurchmesser ( $2r$ ) abzuschätzen, der sich bei der vollständigen Benetzung (Spreiten,  $\gamma = 0$ ) des Sporopollenins ergeben würde. Aus der Gleichung (13) ergibt sich für Ethanol ein Kapillarradius von mindestens  $4,4 \mu\text{m}$ . Dieser Wert ist in Anbetracht eines minimalen Kapseldurchmessers von  $26 \mu\text{m}$  (vgl. Tabelle 2) und eines Interpartikelvolumen der Sporopolleninkapseln von etwa 38-39 % (vgl. Tabelle 6) des Packungsvolumens [Bohne et al., 2005] realistisch.

Möglicherweise ist der Kontaktwinkel von Ethanol zu Sporopollenin nicht viel größer als Null. Da die Kapillarkraft proportional zu  $\cos \gamma$  und zur Oberflächenspannung  $\sigma$  ist, kann Ethanol, dessen Oberflächenspannung kaum ein Drittel von Wasser aufweist, das Sporopollenin deutlich besser benetzen als Wasser, obwohl beide Flüssigkeiten gleich große Kapillarspannungen in den Partikelbetten entwickelten. Unter der Voraussetzung, dass der Kontaktwinkel des Ethanols den Wert 0 annimmt, ergibt sich für Wasser ein Wert von ca.  $74^\circ$ . Der unter gleichen Voraussetzungen abgeschätzte Wert des Kontaktwinkel von n-Heptan zu Sporopollenin liegt mit ca.  $78^\circ$  etwas höher.

#### 4.1.2.2 Quellung getrockneter Kapseln in Ethanol, Wasser, Aceton und n-Heptan

Das Quellungsverhalten von Sporopolleninkapseln wurde untersucht, indem die Kapseln aus Wasser, Ethanol, Aceton oder n-Heptan getrocknet und anschließend in allen Flüssigkeiten resuspendiert wurden. Der Quellungsprozess wurde qualitativ durch lichtmikroskopische Beobachtungen (Tabelle 11) und quantitativ durch Feststellen der Sedimentationshöhe erfasst (Abb. 22). Die Kapseln quollen in Aceton und n-Heptan langsam und unvollständig, sie entfalteten sich nicht vollständig, trocknungsbedingte Verklebung blieb teilweise erhalten.

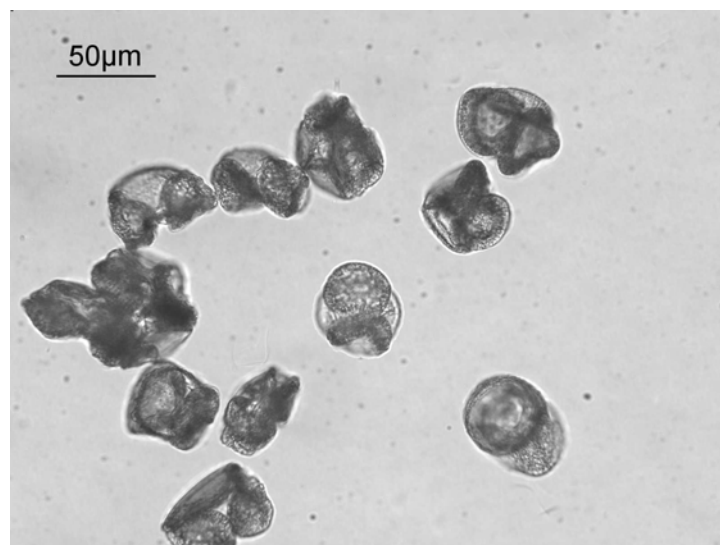


Abb. 20: Sporopolleninkapseln aus Ethanol getrocknet und in Wasser gequellt; Kiefer (*P. nigra*).

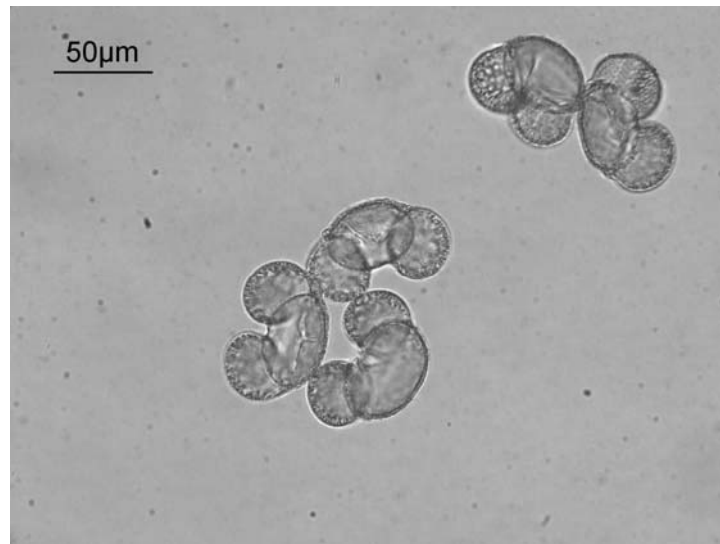


Abb. 21: Sporopolleninkapseln, aus Wasser getrocknet und darauf in Ethanol gequellt, in Wasser mikroskopiert; (P. nigra).

Tabelle 11: Quellvermögen von Sporopolleninkapseln in verschiedenen Flüssigkeiten nach dem lichtmikroskopischen Bild. Legende: +, vollständige Quellung (Abb. 21); —, Kapseln nicht voll entfaltet, konkave Oberfläche (Abb. 20); ±, nur einige Kapseln sind vollständig gequollen, Ergebnisse nach Sacci und Zentralkapsel getrennt; Kapseln (P. nigra)

		Trocknung erfolgte aus			
		Wasser	Ethanol	Aceton	n-Heptan
A: Zentralkapsel					
	Quellungsflüssigkeit				
	Wasser	±	—	±	±
	Ethanol	+	+	+	+
	Aceton	—	—	—	—
	n-Heptan	—	—	—	—
B: Sacci					
Quellungsflüssigkeit					
	Wasser	±	—	±	±
	Ethanol	+	+	+	+
	Aceton	±	±	+	+
	n-Heptan	—	—	+	±

Auffällig war, dass die aus Ethanol getrockneten Pollenexinen sehr stark geschrumpft waren und sich in Wasser, Aceton und n-Heptan besonders langsam entfalteten (Abb. 20). Ethanol erwies sich als das beste der untersuchten Quellungsmittel (Abb. 21). Die beim Trocknen geschrumpften Kapseln entfalteten sich vollständig und zwar unabhängig von der Flüssigkeit, aus der sie getrocknet wurden. Die Exinen zeigten anschließend nur geringe Aggregationen. Auch die Quellung in Ethanol verlief am langsamsten bei den Proben, die zuvor aus Ethanol getrocknet wurden. Die Erklärung hierfür liegt darin, dass die Sporopolleninwände der Kapseln beim Trocknen aus Ethanol nach kohäsiver Annäherung und Berührung besonders stark miteinander verquellen und beim Verdunsten der Flüssigkeit stärker verkleben als bei der Trocknung aus schlechteren Quellflüssigkeiten (Tabelle 11). Wenn Ethanol das stärkste der untersuchten Quellungsmittel für das Sporopollenin der Kiefernexine ist, sollte sich das Sedimentvolumen einer definierten Menge dieser Kapseln verringern, wenn diese im vollständig entfalteten Zustand aus Ethanol in Wasser, Aceton oder n-Heptan überführt werden. Dies wurde auch festgestellt (Abb. 22).

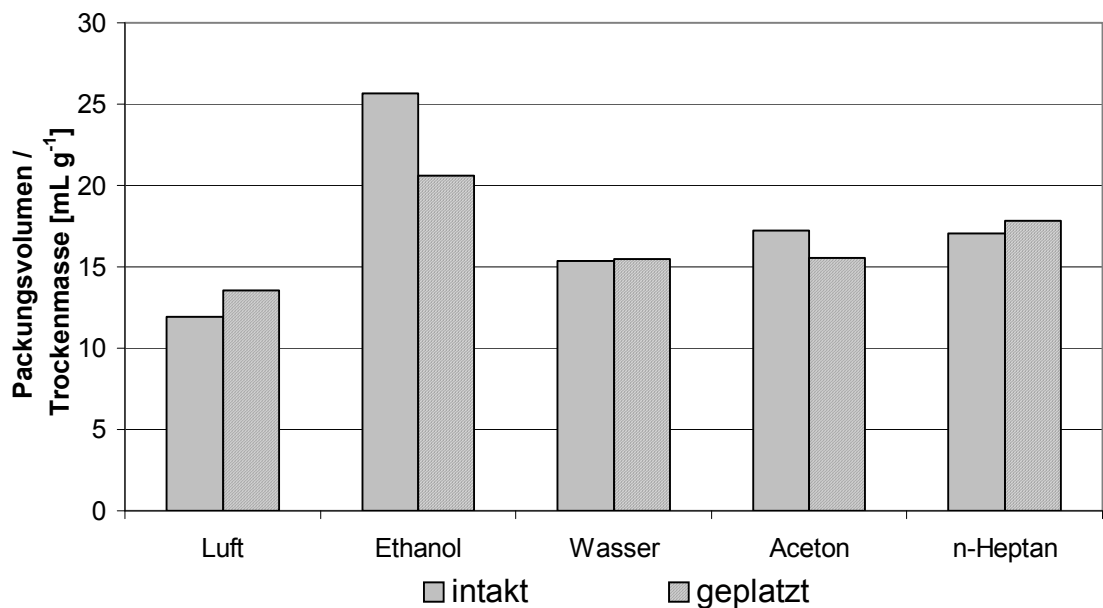


Abb. 22: Festbettvolumina gepackter Sporopolleninkapseln in unterschiedlichen Flüssigkeiten und in Luft. 1 g Kapseln (*P. nigra*) wurde in den jeweiligen Flüssigkeiten 5 min lang bei einer Beschleunigung von 313 g sedimentiert. Luft: Sedimentvolumen nach Trocknung aus Aceton.

Das geringste Volumen des Sedimentes wurde in Wasser festgestellt, während die Pollen in Aceton und n-Heptan ein etwas besseres Quellverhalten zeigten. Sporopolleninkapseln, selbst diejenigen, deren Zentralkapsel geöffnet (vgl. 4.1.3.4) wurde, flottierten größtenteils in der Suspension, wenn das Ethanol durch Wasser ersetzt wurde, da sich im Lumen eine Gasblase gebildet hatte. Nur durch wiederholtes Zentrifugieren konnte eine Sedimentation der ganzen Probe erreicht werden.

#### 4.1.2.3 Absorption von Wasser und Verteilung gelöster Stoffe in gequollenem Sporopollenin

Eine wesentlich Voraussetzung zur Bestimmung der Wasserabsorptionskapazität des Sporopollenins von Kiefernexinen besteht darin, dass die Untersuchung an gereinigten Exinefragmenten durchgeführt wird, die das Wasser ausschließlich in der Polymermatrix und nicht in den abgeschlossenen Hohlräumen absorbieren. Die gravimetrische Methode zur Erfassung der Wasserabsorptionskapazität von Sporopollenin ist nicht einsetzbar, weil die Gewichtszunahme der Partikel nach deren Sättigung mit Wasser zum größten Teil auf der Adhäsion eines Wasserfilms an deren Oberfläche beruht. Die bisher dargestellten Ergebnisse zeigen aber, dass Dextran T70 mit einer

mittleren Molmasse von  $70 \text{ kg mol}^{-1}$  nicht in die feinen Poren der Sporopolleninmatrix permeiert, aber sehr schnell durch die saccale Sexine in die Luftsäcke dringt. Daher ist die Wasser-Absorptionskapazität leicht aus der Konzentrationszunahme von Dextran T70 bestimmbar, die sich ergibt, wenn dehydrierte Exinefragmente in einem definierten Volumen dieses Dextrans quellen. Ein ähnliches Verfahren kann auch zur Bestimmung des Verteilungsraumes niedermolekularer Stoffe im wassergefüllten Porenraum der Sporopolleninmatrix eingesetzt werden.

Eine definierte Masse trockener Exinefragmente wird mit einem begrenzten Volumen  $V_L$  einer wässrigen Lösung der Teilchenkonzentration  $C$  äquilibriert. Wenn ein gegebenes Teilchen auf Grund seiner Größe von einem signifikanten Anteil des Porenvolumens in der Sporopolleninmatrix ausgeschlossen wird (Größenausschlusseffekt), nimmt dessen externe Konzentration um einen bestimmten Wert  $\Delta C$  zu. Wenn 200 mg trockene Exinefragmente (mittlere Größe  $< 10 \mu\text{m}$ ) in einem Volumen 6 mL einer Zucker- oder Dextranlösungen suspendiert wurden (Tabelle 12), nahm die Polymerkonzentration zu ( $c^* > c$ ). Die Konzentration nimmt dann zu, wenn die gelösten Moleküle eine geringere Konzentration im Porenraum besitzen als im äußeren Medium. Falls Adsorptionseffekte vernachlässigt werden können, ergibt sich das Ausschlussvolumen aus der relativen Konzentrationszunahme und dem Volumen der eingesetzten Lösung. Im Falle der vollständig ausgeschlossenen Moleküle des Dextran T70 kann dessen Volumen dem wassergefüllten Porenraum gleichgesetzt werden. Im Falle von Dextranen mit kleinerem Molekülradius, die durch die Exine, wenn auch langsam, permeieren und im Fall von Zuckern ist das Ausschlussvolumen kleiner und natürlich nicht identisch mit einem scharf abgrenzbaren Volumenanteil hinreichend kleiner Poren, die den betreffenden gelösten Stoff ausschließen; denn bekanntlich ist die Konzentration gelöster Stoffe in einer Pore oder einem Intermicellarraum auch dann bereits deutlich reduziert, wenn der Porenradius für die Diffusion des gelösten Stoffes ausreicht, aber in der Größenordnung der Teilchengröße liegt. Der von der Molekülgröße abhängige Verteilungsraum eines permeablen Stoffes ist ebenso zu interpretieren wie das größenabhängige Elutionsvolumen bei der Größenausschlusschromatographie mit Xerogelen (Kieselgel, Sephadex etc.). Er stellt eine theoretische Größe dar, die unter der Voraussetzung des Konzentrationsausgleichs berechnet wird, jedoch keine Aussage über den Volumenanteil von Poren bestimmter Größe ermöglicht. Aus der Zunahme der Konzentration permeabler Stoffe kann allenfalls ein theoretisches Ausschlussvolumen  $V^*$ , berechnet und auf die eingesetzte Masse der getrockneten Exinefragmente bezogen werden. Unmissverständlich ist es daher, wenn aus der quellungsbedingten relativen Konzentrationsänderung permeabler Stoffe ein mittlerer Verteilungskoeffizient berechnet wird.

Dextran T20 besitzt bereits einen, wenn auch sehr kleinen, Verteilungsraum in dem untersuchten Feststoff Sporopollenin, der erst durch vollständige Desintegration der Mikrokapseln messbar wurde. Erfolgte die Wasseraufnahme aus einer Lösung von Dextran T70 ( $r_s$ , vgl. Tabelle 1), stieg die Polymerkonzentration signifikant stärker (95 % Konfidenzniveau) an als bei der Aufnahme von Dextran T20. Wurden die Exinefragmente in einer Lösung von Methylglucosid suspendiert, stieg die Konzentration des Zuckers nur geringfügig an. Aus der Zunahme der Konzentration

( $\Delta c = c^* - c$ ) wurde ein bestimmtes Porenvolumen, das Wasser absorbiert, jedoch die darin gelösten Teilchen ausschließt, berechnet (vgl. 3.7) und auf die eingesetzte Masse der getrockneten Exinefragmente bezogen. Das Ausschlussvolumen  $V_A$  für Dextran T70, welches der Wasserabsorptionskapazität entspricht, beträgt  $180 \mu\text{L}$  je Gramm Exinefragmente. Die Dichte des Sporopollenins der Kiefer wurde mit ca.  $1,13\text{--}1,14 \text{ kg L}^{-1}$  durch Bestimmung der isopyknischen Cäsiumsulfatkonzentration (Übergang vom Sedimentieren der Fragmente zum Flottieren) gemessen. Unter Berücksichtigung dieses Wertes entspricht der Volumenanteil der Wasserabsorption 20,6 %. Dieser Wert entspricht annähernd der maximalen Kapazität, da der osmotische Druck der verwendeten Dextranlösungen ( $< 0,09 \text{ hPa}$ ) zu vernachlässigen ist. Das Ausschlussvolumen des gelösten Stoffes ( $V_A$ ) bezogen auf die Wasserabsorptionskapazität ( $V_A$  von Dextran T70) wurde aus den jeweiligen Konzentrationsänderungen berechnet:

$$V_A = \frac{\Delta c}{\Delta c^*} \frac{V}{TM} \quad (14)$$

Dabei ist  $\Delta c$  die Konzentrationszunahme des permeierenden Stoffes und  $\Delta c^*$  die des ausgeschlossenen Stoffes,  $V$  das Volumen der Probelösung und  $TM$  die Trockenmasse der Exinefragmente. Für die Bestimmung der mittleren Verteilungskoeffizienten der Stoffe im Wasservolumen wurde  $V_A$  auf  $V^*$  bezogen. Die Werte liegen zwischen 0,85 für das Monosaccharid und 0,14 für Dextran T20. Der geringe Wassergehalt des Sporopollenins ist dem kristallinen Cellulosefibrillen vergleichbar und spiegelt den hohen Feststoffanteil der Exine wider (s. 5.1.1).

Tabelle 12: Wasserabsorption des Sporopollenins aus Lösungen mit unterschiedlicher Molekülgröße. 200 mg lyophilisierte Exinefragmente (*P. sylvestris*) wurden zu 6 mL der jeweiligen Lösung gegeben; die Ausschlussvolumina unterscheiden sich auf dem 95 % Konfidenzniveau signifikant (LSD-Test); n = 5

Lösung	Relative Zunahme der Konzentration gelöster Stoffe [%] nach Äquilibration mit lyophilisierten Exinefragmenten [33,3 mg mL <sup>-1</sup> ]	„Ausschlussvolumen“ (V <sub>A</sub> ) des gelösten Stoffes im Wasservolumen [ml g <sup>-1</sup> Sporopollenin]	SD	Mittlerer Verteilungskoeffizient im Dextran T70-Ausschlussvolumen
Dextran T70	0,69	0,180	0,023	0,00
Dextran T20	0,59	0,155	0,009	0,14
Raffinose	0,26	0,069	0,012	0,62
α-Methylglucosid	0,10	0,027	0,008	0,85

Das Zuckermonomer blieb von maximal 15 % des Porenraumes ausgeschlossen (Tabelle 12).

#### 4.1.2.4 Titrationskurven von wässrigen Suspensionen der Sporopolleninkapseln

Um Wechselwirkungen des Sporopollenins mit verschiedenen Flüssigkeiten interpretieren zu können, wurde das Vorkommen dissoziationsfähiger Gruppen durch Titration untersucht. Vorversuche hatten gezeigt, dass die Gleichgewichtseinstellung des pH-Wertes im mittleren pH-Bereich (4-10), sehr langsam erfolgte.

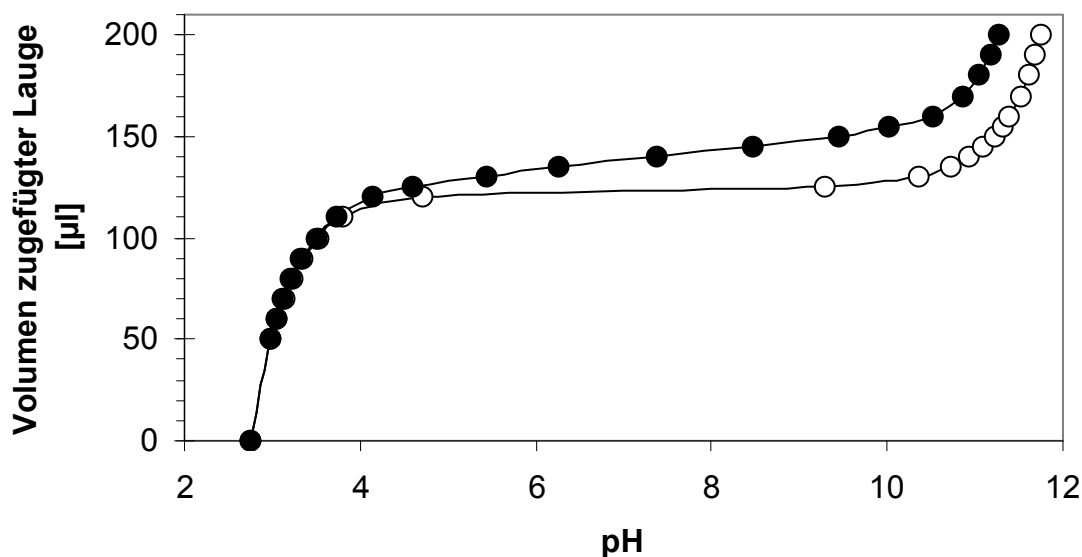


Abb. 23: Titration einer Suspensionen von Sporopolleninkapseln von pH 3 bis pH 11. Die Kapseln (250 mg, *P. nigra*) wurden in einer Vorlage (12 mL) von 0,05 M Kaliumsulfat und 3 mM Schwefelsäure suspendiert und mit 0,5 M NaOH titriert. ● – verbrauchte Lauge der Suspension, ○ – verbrauchte Lauge der Vorlage.



Nach jeder Zugabe von Natronlauge kam es anfangs zu einer schnellen Erhöhung des pH-Wertes und anschließender Abnahme. Um den hierdurch auftretenden Fehler möglichst gering zu halten, wurde erst fünf Minuten nach jeder Alkalizugabe der pH-Wert abgelesen. Die Abb. 23 zeigt die Titrationskurven einer Suspensionen gereinigter Sporopolleninkapseln von *Pinus nigra*. Die Titrationskurven unterschieden sich hinreichend von den Titrationskurven der Vorlagen, um den spezifischen Laugenverbrauch der Kapseln zu ermitteln (Tabelle 13). Sporopolleninkapseln von *P. nigra* zeigten im untersuchten pH-Bereich 4 bis 10 eine annähernd pH-unabhängige Pufferkapazität.

Tabelle 13: Pufferwirkung von Sporopolleninkapseln bei niedrigen und hohen pH-Werten; Kapseln (*P. nigra*), Mittelwerte und Standardabweichung; n = 3

	Spezifischer NaOH-Verbrauch [ $\mu\text{mol g}^{-1} \text{ TM}$ ]	
	pH-Bereich 4 bis 7	pH-Bereich 7 bis 10
<i>Pinus nigra</i>	23,4 $\pm$ 1,8	27,5 $\pm$ 4,5

Da Sporopollenin ausschließlich aus den Elementen C, H und Sauerstoff aufgebaut ist sowie aromatische Funktionen enthält [Wilmesmeier et al., 1993; Ahlers et al., 2000] sind die Funktionen, die im schwach sauren pH-Bereich dissoziieren, Carboxylgruppen, und die, welche im alkalischen puffern, vermutlich phenolische Hydroxylgruppen. Während der Titration fiel auf, dass besonders im mittleren pH-Bereich der pH-Wert nach Zugabe der Laugen relativ schnell anstieg, bevor er danach sehr langsam wieder auf den Endwert abfiel. Dies kann dadurch erklärt werden, dass ein Teil der puffernden Funktionen innerhalb der Sporopolleninschicht lokalisiert ist und die Reaktion zwischen diesen Funktionen und der äußeren Flüssigphase durch die mikroporöse Matrix verzögert wird. Sporopolleninkapseln der Kiefer wiesen eine niedrigere Pufferkapazität als die pentaporaten Sporopolleninkapseln von *Alnus glutinosa* [Wilke, 2002] auf. Dies muss nicht allein an der geringeren Konzentration dissoziationsfähiger Gruppen liegen, sondern kann auch in einer unterschiedlichen Zugänglichkeit dieser Gruppen begründet sein.

#### 4.1.3 Hydraulische Leitfähigkeit der Nexine und osmotische Eigenschaften der Zentralkapsel

##### 4.1.3.1 Trocknungsexperimente: Evaporation von hydrierten Sporopolleninkapseln und von gequollenen, reifen Pollenkörnern

Für die Bestimmung der physiologisch bedeutsamen hydraulischen Leitfähigkeit der Exine an der Zentralkapsel sind die bisher verwendeten Methoden zur Permeabilitätsbestimmung nicht geeignet, weil sie sich auf die diffusive Permeabilität bei vernachlässigbarem Volumenfluss beziehen. Zur Messung der hydraulischen Leitfähigkeit müssen Volumenänderungen der Kapseln hydraulisch oder osmotisch induziert werden.

Bereits eine einfache gravimetrische Analyse zeigte, dass die Exine einen (im Vergleich zum Protoplasten) relativ geringen Widerstand für den Volumenfluss bewirkt. Suspensionen von Sporopolleninkapseln oder in entionisiertem Wasser gequollene Pollenkörner wurden unter einer Lichtquelle auf einer Waage so getrocknet, dass am Ende eine dünne Schicht der feuchten Partikel (33 bis 40 mg auf 2 cm<sup>2</sup>) vorlag, deren Wasserabgabe in Abhängigkeit vom Wassergehalt aufgezeichnet wurde (Abb. 24). Bei der Verdunstung reinen Wassers nahm die Evaporationsrate sehr schnell ab, nachdem die vollständige Benetzung der Oberfläche nicht mehr gegeben war. Auch beim Trocknen der dünnen Schicht wassergefüllter Sporopolleninkapseln zeigte sich ein schneller Übergang vom Zustand der vollständigen Quellung bis zur vollständigen Trockenheit. Die Evaporation von intakten Partikeln erfolgte deutlich verzögert.

Aus den Ergebnissen geht bereits hervor, dass die Evaporation nicht allein durch die Exine begrenzt wird, vor allem, wenn der Wassergehalt bereits reduziert ist.

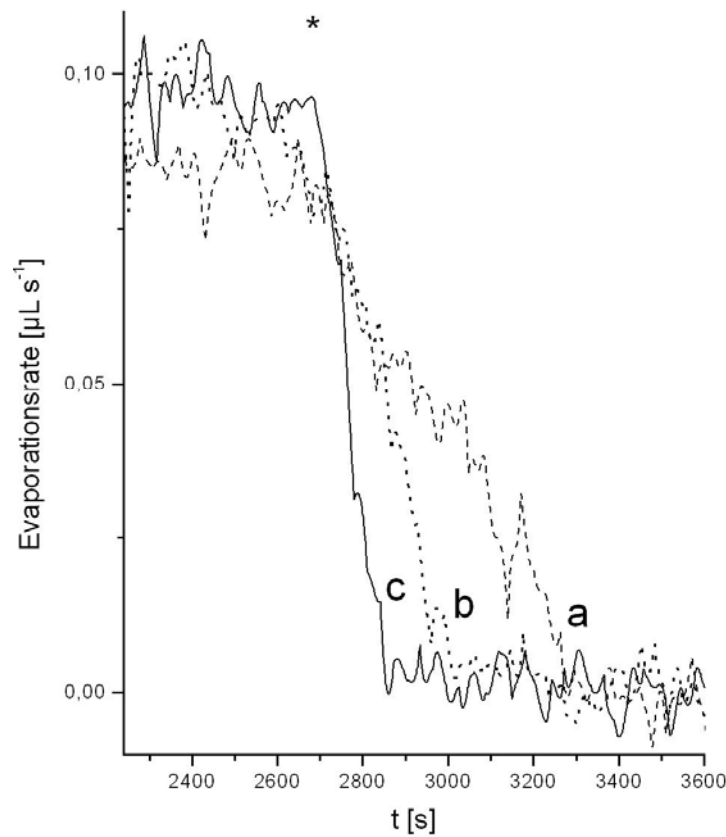


Abb. 24: Vergleich der gravimetrisch bestimmten Verdunstungsraten von wassergesättigten Pollenkörnern und Sporopolleninkapseln. Die Geschwindigkeit der Evaporation aus wässrigen Suspension von: (a) intakten, gequollenen Pollenkörnern (ca. 10 mg TM); (b) Sporopolleninkapseln (ca. 3 mg TM); (c) Verdunstung von reinem Wasser mit Schälchen. Der Wassergehalt der Partikel betrug in beiden Fällen ca. 30  $\mu\text{L}$ ; dargestellt ist die Verdunstungsgeschwindigkeit vor dem vollständigen Austrocknen. \* Beginn der intrapartikulären Verdunstung; man beachte die unterschiedliche Strichstärke. Die Evaporation wurde durch eine Lichtquelle ( $250 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) beschleunigt; Material: *P. sylvestris*.

#### 4.1.3.2 Osmotisch induziertes Schrumpfen der wassergefüllten Zentralkapsel

Wurden wassergesättigte Sporopolleninkapseln der Kiefer in osmotisch wirksame Zucker- oder Salzlösungen überführt, so konnte ein rasches Schrumpfen der Zentralkapsel beobachtet werden (Abb. 25). Die Kapseln schrumpften jedoch nicht, wenn die Konzentration des Zuckers oder Salzes langsam gesteigert wurde. Auf diese Weise konnten die Zentralkapsel mit hohen Konzentrationen von gelösten permeablen Teilchen äquilibriert werden, ohne dass dieselben schrumpften. Jedoch konnte das Schrumpfen der Kapseln nicht verhindert werden, wenn Natriumpolyacrylat mit einer mittleren Molmasse von  $2100 \text{ g mol}^{-1}$  als Osmotikum verwendet wurde, auch dann nicht, wenn der osmotische Druck langsam ( $0,1 \text{ kPa min}^{-1}$ ) erhöht wurde.

Es wurde versucht, die osmotisch bedingten Größen- und Formänderungen in ihrem Zeitverlauf quantitativ mit einem Partikel-Sizer (Analysette A22, Fritsch GmbH) zu erfassen. Dabei konnte zwar der Zeitverlauf diskontinuierlich charakterisiert werden; jedoch war eine quantitative Auswertung der Volumenänderungen auf Grund der komplexen Geometrie der Kapseln nicht möglich.



Abb. 25: Sporopolleninkapseln der Kiefer schrumpfen in 5 %iger Natriumpolyacrylatlösung rasch und dauerhaft. Da das Osmotikum von der Zentralkapsel (*P. sylvestris*) ausgeschlossen bleibt, gibt dieselbe Wasser ab und schrumpft, wobei die Luftsäcke sich einander nähern; Osmotikum: Na-Polyacrylat 2100,  $c = 50 \text{ g L}^{-1}$  ( $\pi = 0,47 \text{ MPa}$ ).

Da die im folgenden dargestellte polarimetrische Methode die Volumenänderungen genauer wiedergibt, wird auf die Darstellung der Größenänderungen mit der Analysette verzichtet.

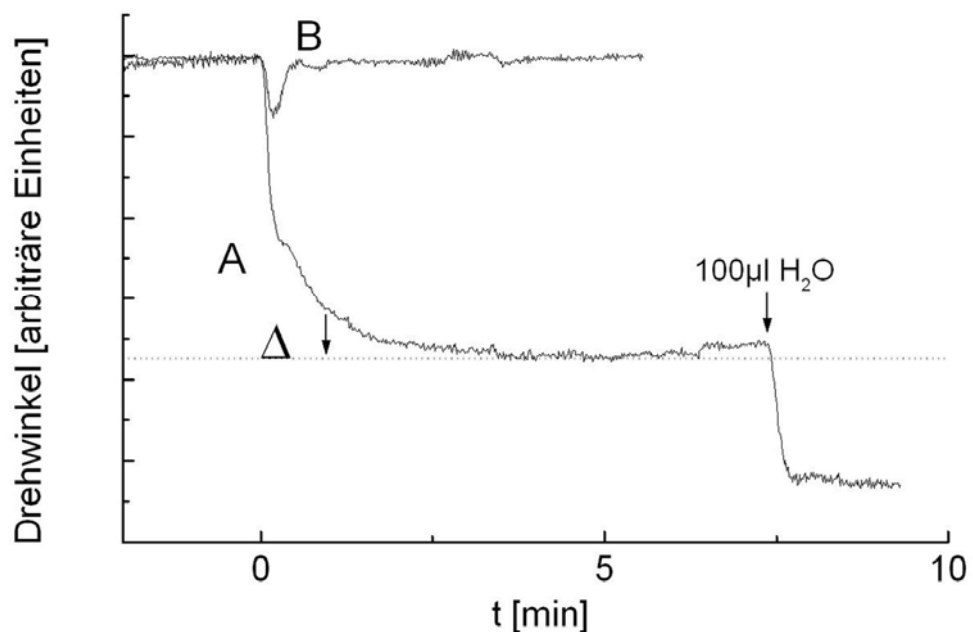


Abb. 26: Osmotisch induzierter Efflux von Wasser aus der Zentralkapsel. (A) Änderung der Dextrankonzentration nach der Zugabe von Natriumpolyacrylat. Das polarimetrische Messsystem enthielt 902 mg FM von gepackten, wassergesättigten Sporopolleninkapseln (*P. sylvestris*). Dextrankonzentration,  $30 \text{ g L}^{-1}$ ; Volumen außerhalb der Zentralkapsel, 9 mL; Volumen der Zentralkapsel  $V_C$ , 322  $\mu\text{L}$ . Bei  $t_0$  wurde 0,5 mL einer Dextran/Natriumpolyacrylat-Lösung zugegeben (Endkonzentration von Polyacrylat =  $24 \text{ g L}^{-1}$ ,  $\pi = 0,225 \text{ MPa}$ ). Die Messskala wurde durch Zugabe (Pfeil) von Wasser (100  $\mu\text{L}$ ) kalibriert. (B) Kontrollexperiment, bei dem das Osmotikum zu der Dextranlösung ohne suspendierte Kapseln gegeben wurde. Die transiente Änderung des Drehwinkels wurde durch Schlieren in der Polarimeterzelle verursacht.

Für eine Bestimmung der hydraulischen Leitfähigkeit ( $L_P$ ) der Exine wurden osmotisch induzierte Wasserfluxe aus vorgesättigten Kapseln in eine polymere Dextranlösung (70 kDa;  $r_s = 4,56$  nm) mit Hilfe des polarimetrischen Mess-Systems (s. Abb. 5) kinetisch untersucht. Das verwendete Dextran T70 dringt nicht in die Kapseln ein (vgl. Abschn. 4.1.1.3). Das Messprinzip beruht auf der polarimetrischen Erfassung der Verdünnung des Dextranmediums durch den osmotisch induzierten Wasserstrom aus den Kapseln. Dabei kann die sehr hohe Relativgenauigkeit der Konzentrationsmessung mit dem Polarimeter genutzt werden [Ehwald et al., 1973b]. Deutliche Effekte wurden bei osmotischen Belastungen von 20 bis 600 kPa registriert.

Die bereits beschriebene Apparatur (Abb. 5) wurde benutzt um den Zeitverlauf der Wasserabgabe aus den Kapseln, und damit deren Schrumpfung, zu registrieren. Der Wasserefflux, welcher durch die Zugabe von Natriumpolyacrylat induziert wurde, war nach etwa fünf Minuten abgeschlossen (Abb. 26).

Direkt nach Zugabe der konzentrierten Lösung bildeten sich vorübergehend Schlieren, die durch die begrenzte Fließgeschwindigkeit des Filtrats im Messsystem erst nach 90 Sekunden das Aufzeichnen der Wasserflussrate ermöglichten. Dennoch konnte die am Ende erreichte Volumenabnahme sowie deren Abhängigkeit von der Natriumpolyacrylatkonzentration akkurat erhalten werden (Abb. 27). Nahezu das gesamte in den Kapseln enthaltene Wasser konnte mit moderaten osmotischen Kräften 0,6 MPa aus ihnen gesaugt werden.

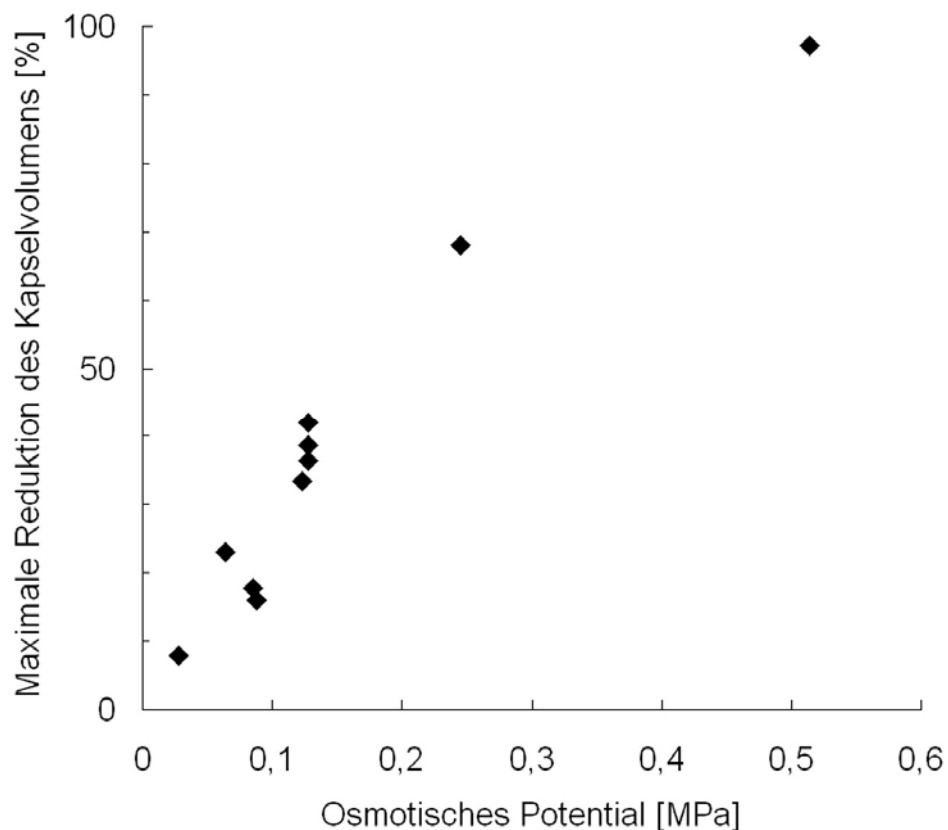


Abb. 27: Abhängigkeit der Kapselschrumpfung vom osmotischen Potential der Natriumpolyacrylat 2100-Lösung. Der Endpunkt der Schrumpfung wurde aus Kurven, wie in Abb. 26, erhalten.

Der Wasserefflux, welcher nach Zugabe von permeablen Osmotika wie Natriumsulfat auftrat, war gefolgt von einer langsamen Wasseraufnahme (Abb. 28). Dieses erneute Schwellen bzw. Entfalten der geschrumpften Zentralkapsel erfolgte sehr viel langsamer als die gleichzeitige Dissipation der osmotischen Kraft, bzw. als die Permeation der Teilchen bis zum Konzentrationsausgleich. Obwohl die Halbwertszeit der Diffusion von Zuckern in die Kapseln nur wenige Minuten beträgt, bleiben die Zentralkapseln in Zuckerlösungen über mehr als 12 Stunden deformiert. Dagegen zeigten sie eine sehr schnelle Wasseraufnahme, wenn sie aus der Zuckerlösung wieder in Wasser überführt wurden.

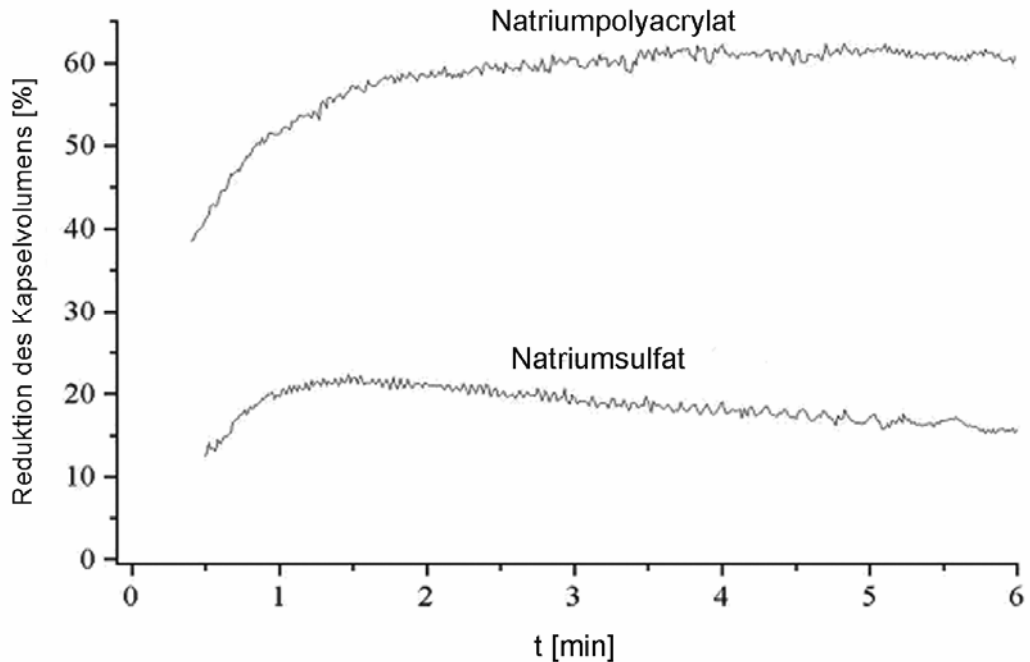


Abb. 28: Zeitverlauf der Volumenänderung der Zentralkapsel durch isotonische Konzentrationen von Natriumpolyacrylat 2100 und Natriumsulfat. Bei Versuchsende ist der osmotische Druck 0,225 MPa, entsprechend 0,035 M Natriumsulfat bzw. 23,9 g L<sup>-1</sup> Natriumpolyacrylat. Der Wasserefflux ist in Prozent des Volumens der Zentralkapsel angegeben. Sporopolleninkapseln wurden aus dem Pollen der Kiefer (*P. sylvestris*) präpariert.

Dagegen entfalteten sich Kapseln, die zuvor in hypotonischen Lösungen von Natriumpolyacrylat geschrumpft waren und nachfolgend in Wasser überführt wurden, sehr langsam, weil das polymere Osmotikum nicht in das Lumen eingedrungen war (Ergebnisse nicht dargestellt). Lag keine Differenz des osmotischen Drucks mehr vor, so zeigte die deformierte Exinekapsel offenbar nur schwache elastische Rückstellkräfte.

#### 4.1.3.3 Hydraulische Leitfähigkeit und Reflexionskoeffizient

Für die Bestimmung der Ultrafiltrationskoeffizienten ( $L_{PD}$ ) wurden die Anfangsraten einer osmotisch induzierten Volumenänderung der wassergefüllten Zentralkapsel benötigt. Diese Anfangsraten konnten wegen der Trägheit des kontinuierlich messenden polarimetrischen Systems den Schreiberaufzeichnungen nicht entnommen werden. Daher wurde die osmotisch induzierte Wasserabgabe diskontinuierlich gemessen. Hierfür wurden konzentrierte Lösungen eines Osmotikums (Natriumsulfat oder Natriumpolyacrylat) und des Dextrans T70 (60 g L<sup>-1</sup>,  $\alpha_0 = 31,850 \pm 0,010^\circ$ , Methode s. 3.7) mit den Suspensionen definierter Mengen von Sporopolleninkapseln gemischt und nach kurzen Zeiten (10 bis 20 s) mit Unterdruck durch ein Nylon-Sieb filtriert. Da sich die Dextran-konzentration in der Suspension und in der Lösung des Osmotikums nur um weniger als 0,01° (< 0,1 %) unterschied und bei Zugabe der Lösung des Osmotikums eine nur kleine Volumenänderung (< 2 %) erfolgte, konnte die erfasste Konzentrationsabnahme mit hoher Genauigkeit in die Menge des abgegebenen Wassers umgerechnet werden.

Der Ultrafilterkoeffizient wurde aus der relativen Volumenänderung der Kapseln ( $\Delta V/V_C$ ), deren Volumen/Oberflächenverhältnisses ( $\beta$ ), aus der Änderung des osmotischen Drucks ( $\Delta\pi$ ), und der Inkubationsperiode  $\Delta t$  berechnet. Unter der Voraussetzung, dass zum einen die Exine für das Osmotikum nicht permeabel ist und zum anderen, dass an der Membranoberfläche keine ungerührten Schichten des Osmotikums auftreten (abhängig von Flussrate und Konzentration), entspricht der

Betrag der hydraulischen Leitfähigkeit einer Membran ( $L_p = J_v / \Delta P$ ) ihrem Ultrafilterkoeffizient ( $L_{PD} = J_v / \Delta \pi$ ). Diese Voraussetzungen treffen für die Hülle der Zentralkapsel (Exine) in einer kräftig gerührten Natriumpolyacrylat-Lösung mit nicht zu hoher Konzentration ( $< 25 \text{ g L}^{-1}$ ) zu. Mit dem Reflexionskoeffizienten  $\sigma$  vergleicht man die hydraulische Effizienz eines Osmotikums an der Membran mit der eines äquivalenten hydrostatischen Druckes. Er ergibt sich als:

$$\sigma = -L_{PD} / L_p \quad (15)$$

Da für ein impermeables Osmotikum  $L_{PD}^* = -L_p$  gilt, kann  $\sigma$  für ein permeables Osmotikum aus dessen Ultrafilterkoeffizient  $L_{PD}$  ( $\sigma = L_{PD} / L_{PD}^*$ ) berechnet werden. In Kurzzeitversuchen (10-12 s) wurden mit relativ geringen osmotischen Drücken geringe Wasserabgaben (5-10 %) induziert. Wurde die Inkubationsdauer auf 20 s verlängert, so nahm der Absolutwert von  $L_{PD}$  kaum ab (Tabelle 14).

Tabelle 14: Ultrafilterkoeffizienten ( $L_{PD}$ ) der Exine an der Zentralkapsel für Natriumpolyacrylat. Die prozentuale Schumpfung wurde für verschiedene Inkubationszeiten und osmotische Druckdifferenzen gemessen; Kapseln (*P. nigra*), Osmotikum, Na-Polyacrylat ( $2100 \text{ g L}^{-1}$ )

	Osmotisches Potential [MPa]			
	-0,09		-0,18	
t [s]	12	20	12	20
Schrumpfung [%]	10,0	16,0	15,2	21,0
$L_{PD} [\mu\text{m s}^{-1} \text{MPa}^{-1}]$	-0,489	-0,472	-0,353	-0,292

Ultrafilterkoeffizienten  $L_{PD}$  ( $= -L_p$ ) für Natriumpolyacrylat 2100 (Tabelle 15) betrugen  $-0,39 \mu\text{m s}^{-1} \text{MPa}^{-1}$  (*P. sylvestris*) und  $-0,48 \mu\text{m s}^{-1} \text{MPa}^{-1}$  (*P. nigra*). Diese Werte liegen in dem Bereich des  $L_{PD}$ , der typisch für Plasmamembranen ( $0,1\text{-}10 \mu\text{m s}^{-1} \text{MPa}^{-1}$ ; [Lösch, 2001]) ist.

Tabelle 15: Ultrafilterkoeffizienten der Exine an der Zentralkapsel. Die Werte für  $L_{PD}$  wurden aus Anfangsraten (Inkubationszeit 10 Sekunden) der Schrumpfung erhalten; \* individuelle Messung

Osmotikum	$\pi$ [MPa]	Ultrafilterkoeffizient $L_{PD} [\mu\text{m s}^{-1} \text{MPa}^{-1}]$	
		<i>Pinus sylvestris</i>	<i>Pinus nigra</i>
Natriumpolyacrylat 2100	-0,090	$-0,387 \pm 0,055$ (n = 9)	$-0,476 \pm 0,144$ (n = 25)
Natriumsulfat	-0,118	-0,227* -0,208*	$-0,285 \pm 0,093$ (n = 15)

Der Ultrafilterkoeffizienten  $L_{PD}$  der Exine für Natriumsulfat beträgt etwa 60 % desjenigen, der für das impermeable Osmotikum bestimmt wurde, so dass der Reflexionskoeffizient  $\sigma$  der Exine für  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  etwa 0,6 ist. Dieser Wert könnte etwas zu gering sein, da der in 10 s erfolgte Einstrom des Salzes in die Zentralkapsel nicht berücksichtigt wurde. Die osmotische Effizienz eines Salzes korrespondiert mit der relativ niedrigen Permeabilität der Exine für Zucker (vgl. Tabelle 4).

#### 4.1.3.4 Osmotisch erzeugtes Platzen der Zentralkapsel

Wenn Sporopolleninkapseln langsam mit konzentrierter Elektrolytlösung beladen werden und dann in Wasser überführt werden, entwickelt sich in der Zentralkapsel vorübergehend ein hoher Druck. Es wurde untersucht, ob die so erzeugten Drücke die Kapsel zum Platzen bringen, dabei wurde die Unversehrtheit der Zentralkapsel durch Ausschluss des Farbstoffs Evans Blau gezeigt (Abb. 29).

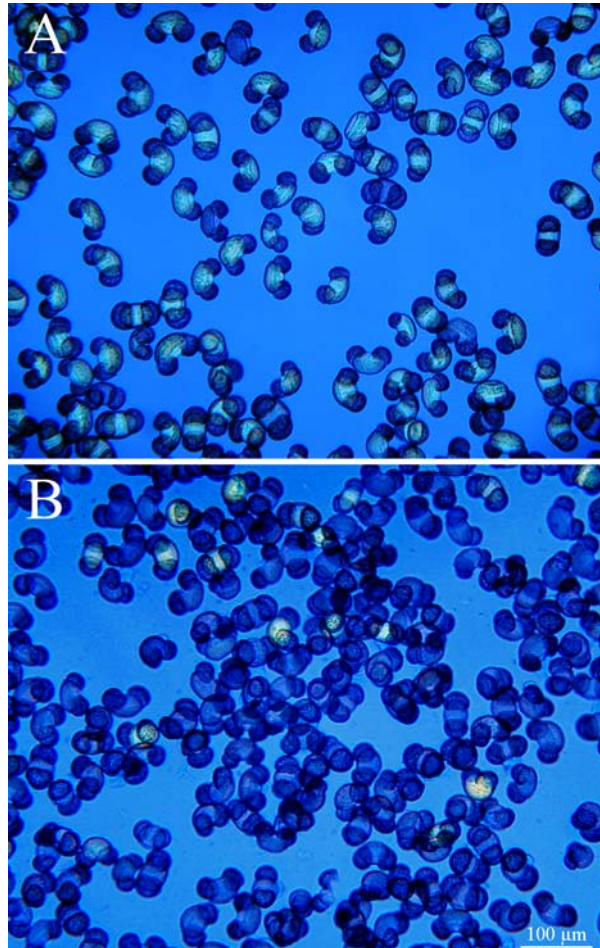


Abb. 29: Integrität der Zentralkapsel vor und nach einem osmotischen Schock. (A) Kontrollpräparation. Nur wenige Kapseln sind (aufgrund von Rissen in der Exine) gefärbt. (B) Präparation nach dem Beladen mit Phosphorsäure (Endkonzentration  $850 \text{ mL L}^{-1}$ ) und nachfolgender Überführung in deionisiertes Wasser. Nur wenige Kapseln schließen den Farbstoff (Evans Blau,  $c = 10 \text{ g L}^{-1}$ ) aus. Die Sporopolleninkapseln wurden aus Pollenkörnern von *P. sylvestris* präpariert.

Dieser Farbstoff (Stokes' scher Radius  $1,3 \text{ nm}$ ) ist tetravalent-anionisch und bleibt von unversehrten Kapseln ausgeschlossen. Die meisten Kapseln überstanden den Transfer von gesättigter Natriumsulfatlösung ( $1,3 \text{ mol L}^{-1}$ ) in Wasser. Ein Großteil der Kapseln platzt in Wasser, wenn dieselben zuvor mit einer gesättigten Lösung von Dihydrogenphosphat ( $7,1 \text{ mol L}^{-1}$ ) beladen wurden. Konzentrierte Phosphorsäure ( $850 \text{ mL L}^{-1}$ ) erwies sich als das effizienteste Osmotikum. Mehr als 90 % der damit beladenen Zentralkapsel platzten beim Überführen in reines Wasser (Abb. 29).

Das osmotische Platzen der Zentralkapselexine konnte ebenso mit intakten Pollenkörnern durchgeführt werden. Wurden intakte Pollenkörner der Kiefer mit konzentrierten Salzlösungen oder Säure beladen und darauf (s.o.) in reines Wasser überführt, so konnte bei einer großen Anzahl der Pollenkörner beobachtet werden, dass der Gametophyt, umgeben von einer intakten Intine, ausgeschleudert wurde (Abb. 30). Die Permselektivität der inaperturaten Exine kann folglich genutzt werden, um reines Sporopollenin zu erhalten, ohne dass eine starke hydrolytische Behandlung nötig wäre, welche die Intine auflöste; jedoch platzte bei einem Teil der Pollenkörner der Sporoplast in das Lumen der Sacci (nicht dargestellt).



Abb. 30: Pollenkorn nach osmotischem Schock. Der denaturierte Gametophyt (*P. nigra*) ist aus der Exine herausgeschleudert worden. Das Pollenkorn wurde langsam mit 85 %iger Phosphorsäure äquilibriert und daraufhin in reines Wasser überführt. Die Fluoreszenzfärbung von Cellulose und Callose mit Calcofluor White ( $c = 0,1 \text{ g L}^{-1}$ ) zeigt, dass der Gametophyt von der Intine umgeben bleibt; Fluoreszenz- und LM-Bild desselben Objekts kombiniert (Photoshop 6.0, Adobe, CA, USA).

## 4.2 Untersuchungen an vitalen, reifen Pollenkörnern

### 4.2.1 Bemerkungen zur Übertragbarkeit der Wasseraufnahmemessung von isolierten Exinen auf reife Pollenkörner

Die bisher dargestellten Ergebnisse lassen erkennen, dass die Exine sich von der Intine durch den geringen Wassergehalt und ihre Barriereigenschaften für niedermolekulare Stoffe unterscheidet. Dabei ist diese Barriere nicht absolut; trotz relativ hoher Reflexionskoeffizienten stellt sich das Diffusionsgleichgewicht für Salze und Zucker in wenigen Minuten ein. Es stellte sich die Frage, ob die an isolierten Exinen gefundenen osmotischen Eigenschaften auch für den reifen Pollen *in vivo* gültig sind. Daher wurde die Kinetik der Wasseraufnahme durch reifen, trockenen Kiefernpollen untersucht. Bei diesen Untersuchungen musste einkalkuliert werden, dass der Zellinhalt des reifen Pollenkorns keine Flüssigphase aufweist. Es war aber beabsichtigt, die letzte Phase der Wasseraufnahme-Kinetik mit den an isolierten Exinen erhaltenen Flüssen zu vergleichen. Um die bereits dargestellte polarimetrische Methode (Abb. 5) einsetzen zu können, wurde der infolge Abgabe optisch aktiver Substanzen aus den Pollen auftretende Fehler analysiert. Die moderne 3D-CLSM-Bildanalyse wurde eingesetzt, um den Verlauf der Wasseraufnahme bzw. die hierdurch zustande kommende Volumenänderung mit den Form- und Oberflächenänderungen zu vergleichen.

Für die Messung mussten zuvor zwei – interessante – Probleme gelöst werden. Zum einen lassen sich die saccaten Pollenkörner dieser Gattung, trotz der ausgesprochenen Hydrophilie der Exine, nicht ohne weiteres in wässrigen Lösungen suspendieren (4.2.2), zum anderen geben reife, lufttrockene Pollenkörner beim Quellen in Wasser Zucker ab und diese Abgabe muss bei den Konzentrationsberechnungen berücksichtigt werden (4.2.3).

### 4.2.2 Formänderung bei der Wasseraufnahme: Entfaltung der ventralen Exine

Werden die lufttrockenen Pollenkörner in wässrige Lösungen gegeben, so sinken sie nicht zu Boden. Die in den Lumina der Sacci eingeschlossene Luft kann von der benetzenden Lösung nicht verdrängt werden und verleiht so Auftrieb. Um eine einheitliche Quellung zu gewährleisten, wurden die Sacci deshalb vor dem Suspendieren mit dem Siliconöl AP100 (Dichte wenig über  $1 \text{ g cm}^{-3}$ ) infiltriert, so dass sie sedimentieren konnten; dabei sind die Sacci und somit der distale Pol des Corpus (ventrale Exine) nach oben orientiert. Wie in Material & Methoden (s. 3.2.6) dargestellt, war es möglich, den Wasser-Absorptionsvorgang durch Zentrifugieren nach verschiedenen Zeiten zu un-



terbrechen, wobei die Pollenkörner aus der wässrigen Phase in das Siliconöl höherer Dichte überführt wurden. Mit den so hergestellten Präparaten konnte der Zeitverlauf der Form- und Volumenänderung untersucht werden (Abb. 31).

Die charakteristische Fluoreszenz des Sporopollenins [Singh und Devi, 1992] ermöglicht die Darstellung von dreidimensionalen Pollenkörnern und Querschnitten der Exine (s. 3.13). In einem lufttrockenen Pollenkorn (Wassergehalt  $0,07 \text{ mL g}^{-1} \text{ TM}$ ) füllt der stark geschrumpfte Protoplast den engen Raum zwischen der abgeflachten Dorsalseite (proximal) und der gefalteten Ventralseite (distal) der kontinuierlichen Exine.

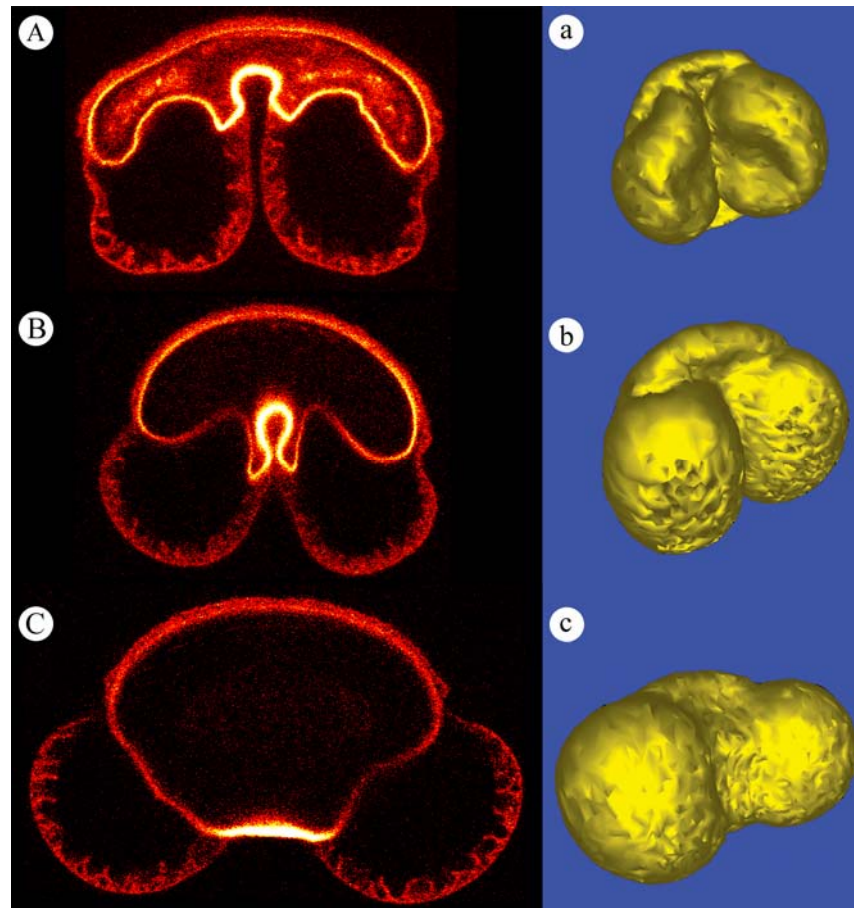


Abb. 31: CLSM-Bilder von reifen Pollenkörnern im Verlauf der Quellung. Optische Äquatorialschnitte (links) und 3D-gerenderte Oberflächen (rechts) der Entfaltung der autofluoreszierenden Exine. (A, a) lufttrocken, (B, b) nach 1 min Quellung, (C, c) nach 3 min Quellung.

Mehrfache Faltungen der Exine vergrößern deren Oberfläche (s. Diskussion 5.1.3.) und halten die konvexen Sacci maximal angenähert (Abb. 31 A, a; vgl. getrocknete Sporopolleninkapseln Abb. 25). In Äquatorialschnitten und 3D-Bildern zeigt die ventrale Exine eine stärker fluoreszierende, zentrale Einfaltung, welche Leptoma (= Schwachstelle) genannt wird [Punt et al., 1994]. Im Bereich des Leptoms ist die alveoläre Sexine weitestgehend reduziert [Rowley et al., 2000b; Meier-Melikyan und Tokarev, 2004]. Die höhere Intensität der Autofluoreszenz in diesem Bereich könnte einer geringeren Konzentration lichtstreuender Materialien oder auch anderer optischer Effekte, z.B. höherer Anteil aromatischer Gruppen, geschuldet sein und sollte nicht als Anzeichen für eine lokal mächtigere Exine fehlinterpretiert werden.

Weitere konkave Oberflächen bildet die Nexine dort, wo sie die Lumina der Sacci vom Corpus trennt. Der optische Querschnitt (A) durch die lange Symmetrieebene des trockenen Pollenkorns zeigt wie laterale Faltungen mit der zentralen Falte verbunden sind. Nach der ersten Minute der Wasserabsorption war die dorsal zuerst abgeflachte Exine bereits konvex (A, a). Wie weiter unten gezeigt wird (4.2.4), beträgt der Wassergehalt nach einer Minute etwa  $0,7 \text{ mL g}^{-1} \text{ TM}$ . Die zentrale Einfaltung der Exine war jedoch noch vorhanden und erschien sogar etwas verstärkt (B). In dieser Anfangsphase der Quellung berühren sich die Sacci noch. Im Querschnitt des Sporoplasten bilden die zentrale Falte (Leptoma) und die beiden lateralen Falten eine Omega-ähnliche Oberfläche (B).

Die Entfaltung dieser ventralen Oberfläche (C, c) ist innerhalb von etwa 3 min abgeschlossen (Wassergehalt  $1,2 \text{ mL g}^{-1} \text{ TM}$ ). Anschließend folgt eine langsamere, letzte Schwellungsphase, die durch eine elastische Ausdehnung der Exine des Corpus charakterisiert ist. Nach etwa 15 min war die Schwellung maximal (s. 4.2.3) und die Sacci wurden in ihre seitliche Position gebracht.

#### 4.2.3 Zuckerabgabe

Wurde lufttrockener Kiefernpollen, der für 6 Monate bei Raumtemperatur gelagert wurde, in Wasser suspendiert, so konnte eine vorübergehende Abgabe optisch aktiver Teilchen beobachtet werden, die etwa 20 bis 30 % des Gesamtgehaltes entsprachen. Dieser Efflux war in den ersten fünf Minuten am stärksten und endete nach etwa 20 Minuten. Sowohl durch die Zugabe von Calciumchlorid als auch durch Reduktion des osmotischen Potentials konnte der Efflux gemindert und/oder verzögert, nicht aber vollständig verhindert werden (Abb. 32).

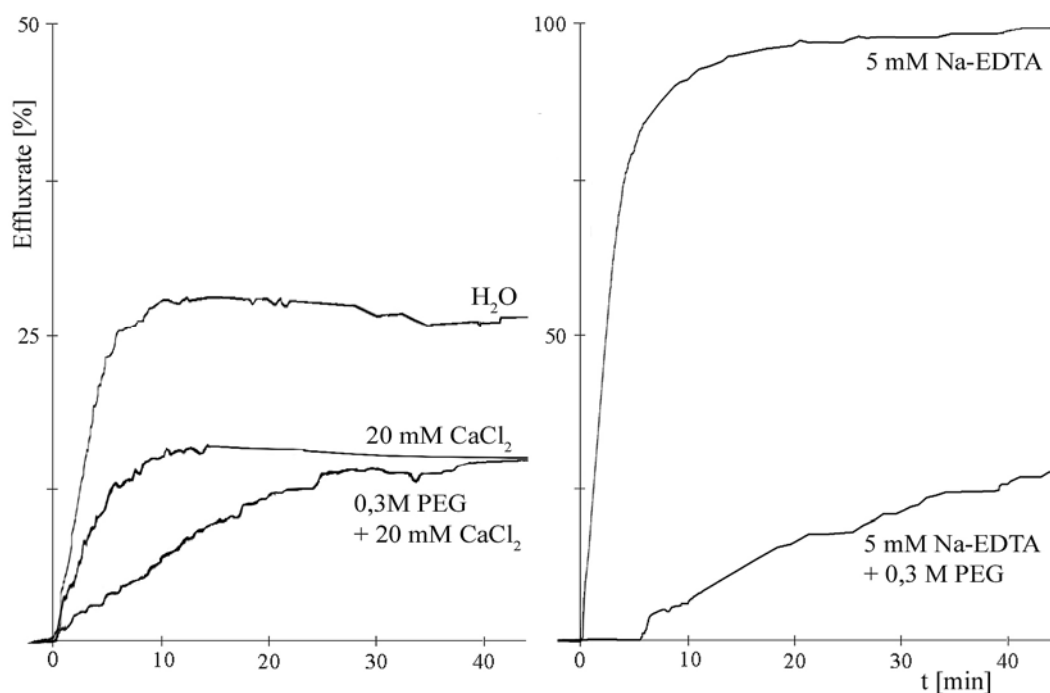


Abb. 32: Abgabe optisch aktiver Stoffe aus Kiefernpollen, die in verschiedenen Medien rehydriert. Zum Zeitpunkt Null wurde 150 mg lufttrockene Pollenkörner (*P. sylvestris*) und 0,4 mL Siliconöl (AS4) zu 10 mL der jeweiligen Flüssigkeit (pH 8) gegeben. Die Zunahme der Dextrorotation im Medium erfolgte hauptsächlich aufgrund Abgabe von Saccharose; exakte Volumina wurden durch Zugabe von 100  $\mu\text{L}$  einer Dextranlösung ( $30 \text{ g L}^{-1}$ ,  $70 \text{ kg mol}^{-1}$ ) kalibriert; der Referenzwert für 100 % Zuckerabgabe wurde in 50 %igem Ethanol gemessen ( $0,360^\circ$ ); Polyethylenglykol (PEG 200,  $M_r = 200 \text{ g mol}^{-1}$ ). Man beachte die unterschiedliche Skalierung der Ordinaten.

Wurde das Experiment auf mehrere Stunden ausgedehnt, so wurden die optisch aktiven Substanzen teilweise reabsorbiert (Ergebnisse nicht dargestellt). Die von quellenden Pollen abgegebenen Stoffe hatten einen positiven Drehwinkel und bestanden hauptsächlich aus Saccharose. Der analytisch bestimmte Saccharosegehalt im Medium betrug  $0,44 \text{ mmol g}^{-1} \text{ TM}$ . Er erklärt gut die gemessene optische Aktivität.

Wurden oberflächlich gebundene Calciumionen mit Hilfe von 5 mM EDTA komplexiert, so nahm die Abgabe optisch aktiver Stoffe kräftig zu. Die Anwesenheit von Chelatoren während der Quellung führte zu nahezu vollständiger Abgabe (Efflux) rechtsdrehender Stoffe (Abb. 32, Tabelle 16). Wurde der EDTA-Lösung 0,3 M PEG zugesetzt, so wurde in derselben Zeit (45 min) nur 25 % der optisch aktiven Stoffe abgegeben. Wenn aber reifer, nur kurz gelagerter Pollen untersucht wurde, betrug der Efflux optisch aktiver Stoffe in deionisiertes Wasser weniger als 5 % und in 5 mM EDTA (pH 8) nicht mehr als 42 % der insgesamt extrahierbaren Menge (Tabelle 17).

Tabelle 16: Prozentuale Abgabe von optisch aktiven Zuckern von quellenden Pollenkörnern in verschiedenen Lösungen nach 10 und 60 min. Die Zuckerabgabe wurde anhand von Polarimeteraufzeichnungen berechnet. 150 mg lufttrockener Pollen (*P. sylvestris*), 6 Monate bei RT gelagert in 10 mL Lösung; n = 5. Die Zuckerabgabe in 50 %igem Ethanol wird als 100 % gesetzt (= 0,360°)

Lösung	Zuckerefflux [%]	
	nach 10 min	nach 60 min
Deionisiertes Wasser	24,4 ± 2,7	26,0 ± 3,2
5 mM Na-EDTA, pH8	90,0 ± 9,8	99,1 ± 12,3
5 mM CaCl <sub>2</sub>	16,4 ± 1,8	16,9 ± 2,1
20 mM CaCl <sub>2</sub>	11,5 ± 1,3	12,3 ± 1,5
0,1 M PEG200	14,1 ± 1,5	16,1 ± 2,0
0,2 M PEG200	8,9 ± 1,0	12,6 ± 1,6
0,3 M PEG200	5,7 ± 0,6	12,0 ± 1,5
0,1 M PEG200 20 mM CaCl <sub>2</sub>	9,4 ± 1,0	10,7 ± 1,3
0,2 M PEG200 20 mM CaCl <sub>2</sub>	5,4 ± 0,6	7,5 ± 0,9
0,3 M PEG200 20 mM CaCl <sub>2</sub>	4,9 ± 0,5	6,2 ± 0,8

Nach eineinhalb-jähriger Lagerung wurde in deionisiertem Wasser ähnlich hohe Stoffabgaben wie in Ethanol erhalten (Tabelle 17).

Tabelle 17: Prozentuale Abgabe von rechtsdrehenden Zuckern bei dem Quellen von unterschiedlich gelagerten Pollenkörner. 150 mg lufttrockene Pollenkörner (*P. sylvestris*) wurden 1 h nach dem Quellen in 10 mL Lösung untersucht. Die Lagerung erfolgte bei 20 °C; n = 5. Die Zuckerabgabe in 50 %igem Ethanol entspricht 100 %

Lagerung Lösung	Abgabe diffusibler Zucker			
	18 Monate		1 Monat	
	[%]	$\Delta\alpha$ [°]	[%]	$\Delta\alpha$ [°]
50 % Ethanol	100	0,392 ± 0,13	100	0,417 ± 0,03
7 mM Na-EDTA, pH 8	100	0,393 ± 0,03	42	0,175 ± 0,03
Wasser	93	0,388 ± 0,01	4	0,017 ± 0,02
20 mM CaCl <sub>2</sub>	76	0,301 ± 0,21	3	0,015 ± 0,01
0,3 M PEG200 20 mM CaCl <sub>2</sub>	74	0,292 ± 0,08	2	0,008 ± 0,01

Selbst bei Anwesenheit von Calciumionen wurden sehr hohe Abgabemengen und -raten gefunden, wenn unreife Pollenkörner untersucht wurden (Ergebnisse nicht dargestellt). Wenn der Anteil an denaturierten Sporoplasten nach Inkubation in CaCl<sub>2</sub>-Lösung, deionisiertem Wasser und

EDTA-Lösung mit der Propidium-Iodid-(PI)- und der Fluorescein-Diazetat-(FDA)-Methode gezählt wurde, zeigten beide Methoden ähnliche Ergebnisse und konnten durch den TTC-Test bestätigt werden!

Die erhaltenen Werte (positive FDA-Färbung des lebenden Cytoplasmas und negative PI-Färbung der Nuclei toter Pollenkörner, s. Material & Methoden 3.14) korrelierten mit dem Anteil abgegebenen Teilchen (Werte nicht dargestellt). In reinem Wasser überlebten z.B. etwa 20 % der 6 Monate gelagerten (vgl. Tabelle 16). Daher erfolgte die Stoffabgabe, welche mit der Quellung in Wasser oder 5 mM EDTA. einhergeht, überwiegend aufgrund des Zusammenbruchs der Membran.

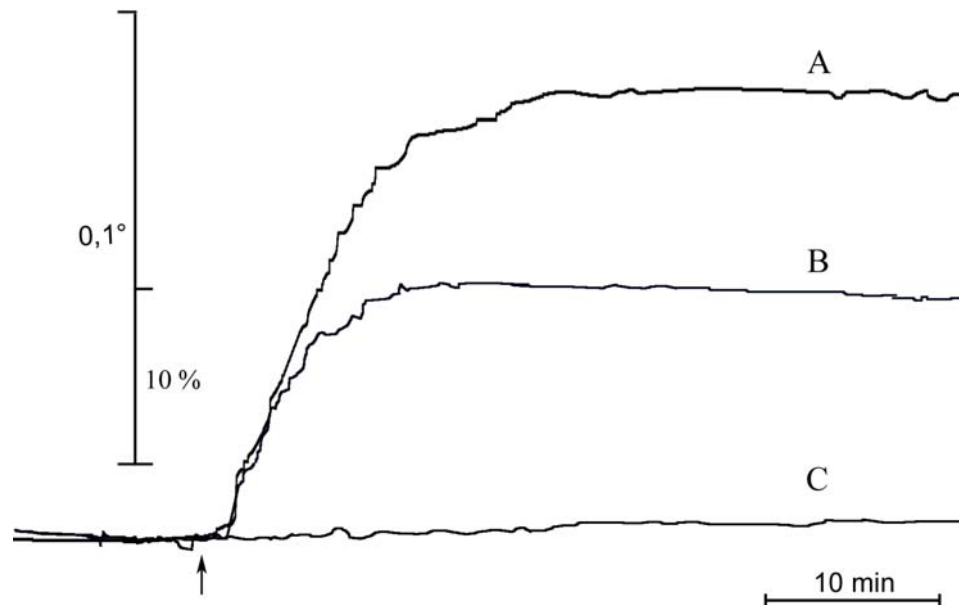


Abb. 33: Abgabe optisch aktiver Stoffe aus quellendem Kiefernpollen an calciumhaltige und calciumfreie Lösungen mit und ohne Vorbehandlung in der Lösung. 150 mg lufttrockene Pollenkörner wurden zum Zeitpunkt Null (Pfeil) in 10 mL Lösung suspendiert: (A) deionisiertes Wasser, (B) 20 mM  $\text{CaCl}_2$ , (C) für 1 h in 20 mM  $\text{CaCl}_2$  hydriert, dann auf einem Nylonfilter für 10 s gewaschen und anschließend in deionisiertem Wasser überführt; Kalibrierung durch Zugabe von 100  $\mu\text{L}$  Wasser bzw. 3 % Dextran T70; Pollenkörner (*P. sylvestris*).

Die Ergebnisse in Abb. 33 zeigen, dass Pollen, der zuvor in calciumhaltigen Lösungen mit Wasser gesättigt wurde, nach Überführung in deionisiertes Wasser keine Saccharose abgibt. Die Hypothese, dass die Vitalität des Sporoplasten besonders beim Quellen in hypotonen Medien mit niedriger Calciumaktivität Schaden nimmt, konnte durch Kurzzeitversuche weiter gestützt werden. Quollen Pollenkörner in einem kleinen Volumen einer calciumhaltigen (1 mL, 20 mM) Lösung und wurden dann mit einem Überschuss EDTA-Lösung (10 mL, 7 mM) 15 Minuten geschüttelt, um freie und adsorbierte Calciumionen zu entfernen, so war die schädigende Wirkung des Chelators nur dann deutlich, wenn seine Zugabe noch während der Phase intensiver Schwellung ( $< 10$  min) erfolgte (Abb. 34).

Das Entfernen der Calciumionen von turgeszenten Pollenkörnern (nach 20 min) resultierte in der geringsten Zuckerabgabe. In Umkehrung des dargestellten Experimentes wurden die Proben in kleinen Mengen der EDTA-Lösungen vorinkubiert und nach unterschiedlichen Zeiten mit einem Überschuss von Calciumchlorid gemischt. 15 min nach Zugabe der Calciumchloridlösung wurde die abgegebene Stoffmenge gemessen. Die Calciumsättigung nach einer kurzen Inkubationsphase (60 s) in der EDTA-Lösung konnte einen starken Efflux noch verhindern. Die Ergebnisse dieses Versuchs zeigen, dass die Membranintegrität beim Quellen weitgehend erhalten blieb, wenn das Fehlen der Calciumionen auf die erste Phase der Wasseraufnahme bzw. auf den Zeitraum vor der Exine-Entfaltung beschränkt war.

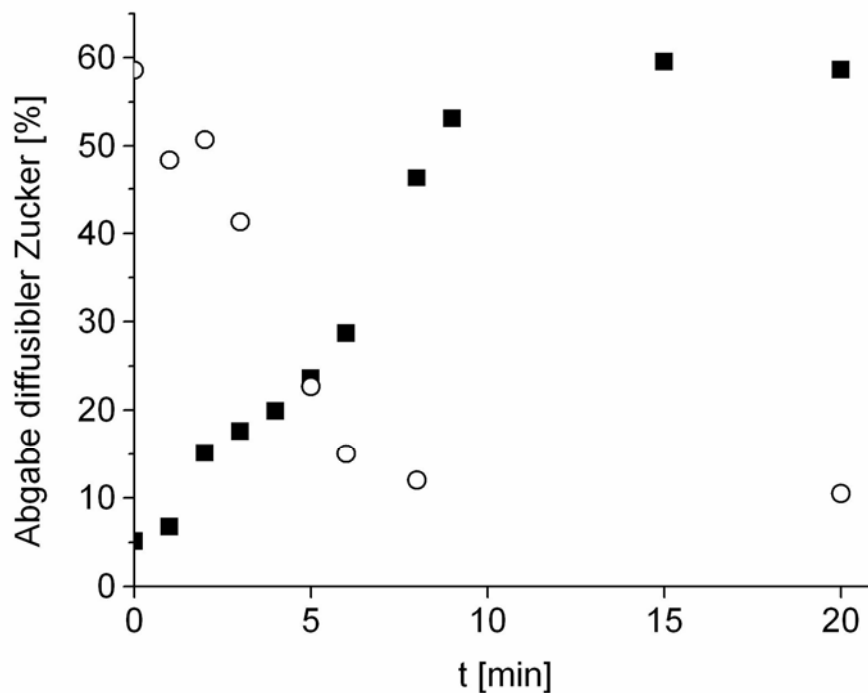


Abb. 34: Abgabe von Zuckern aus quellenden Pollen während der Schwellungsphase nach unterschiedlich langer Vorbehandlung in Lösungen mit niedriger oder hoher Calciumaktivität. 150 mg lufttrockene Pollenkörner (*P. sylvestris*) wurden für verschiedene Zeiten in je 1 mL Lösung, die entweder Na-EDTA (7 mM, pH 8, ■) oder CaCl<sub>2</sub> (20 mM, pH 8, ○) enthielt, gequellt und daraufhin mit einem Überschuss (10 mL) der jeweils anderen Lösung versetzt und für weitere 15 min geschüttelt.

Fehlten die Calciumionen dagegen in der Zeit intensiver Volumen- und Oberflächenzunahme des Sporoplasten, nachdem die Exine entfaltet war (vgl. Abb. 31), so konnte ein nachträglich zugegebener Calciumüberschuss den osmotischen Zusammenbruch der Sporoplasten nicht mehr wirksam reduzieren.

#### 4.2.4 Wasseraufnahmekinetik

Die Wasseraufnahmeraten lufttrockener Pollenkörner (Abb. 35 b und Abb. 36) in Gegenwart von 20 mM CaCl<sub>2</sub> konnten erhalten werden, indem die Drehwinkeländerung in dextranhaltigen und dextranfreien Medien (Abb. 35 a und c) nach Pollenzugabe aufgezeichnet und letztere Kurve von der ersten subtrahiert wurde (vgl. Abb. 35).

Die Experimente wurden bei unterschiedlichen Wasserpotentialen des Mediums durchgeführt, die durch Zusatz von PEG 200 eingestellt wurden. In der Variante mit dem höchsten Wasserpotential wurde ein relativer Wassergehalt (RWC) von 20 bis 25 % innerhalb von 1-2 min, Wassersättigung nach etwa 10 min erreicht (Abb. 36). Bereits in der Anfangsphase war die Wasseraufnahme stark vom osmotischen Potential des Mediums abhängig. In PEG-Lösungen mit einem Wasserpotential von 1,0 MPa wurde die Absorptionsrate nach etwa einer Minute auf ein Fünftel reduziert. Dies ist nicht durch einen geringen Gehalt an osmotisch wirkenden Teilchen in den Sporoplasten zu erklären, denn der Endwassergehalt war nur schwach vom Wasserpotential des Mediums abhängig. Die Reduktion des Endvolumens durch eine Absenkung des Wasserpotentials auf -1 MPa betrug nur 18 %. Daher wäre das osmotische Potential des Protoplasten nach 2 min sehr viel niedriger als -1 MPa, würden alle löslichen Stoffe im Sporoplasten zu diesem Zeitpunkt bereits gelöst vorliegen. Dann allerdings wäre nicht verständlich, warum die Wasserabsorptionsgeschwindigkeit durch eine geringe Absenkung des Wasserpotentials so stark beeinflusst wird.

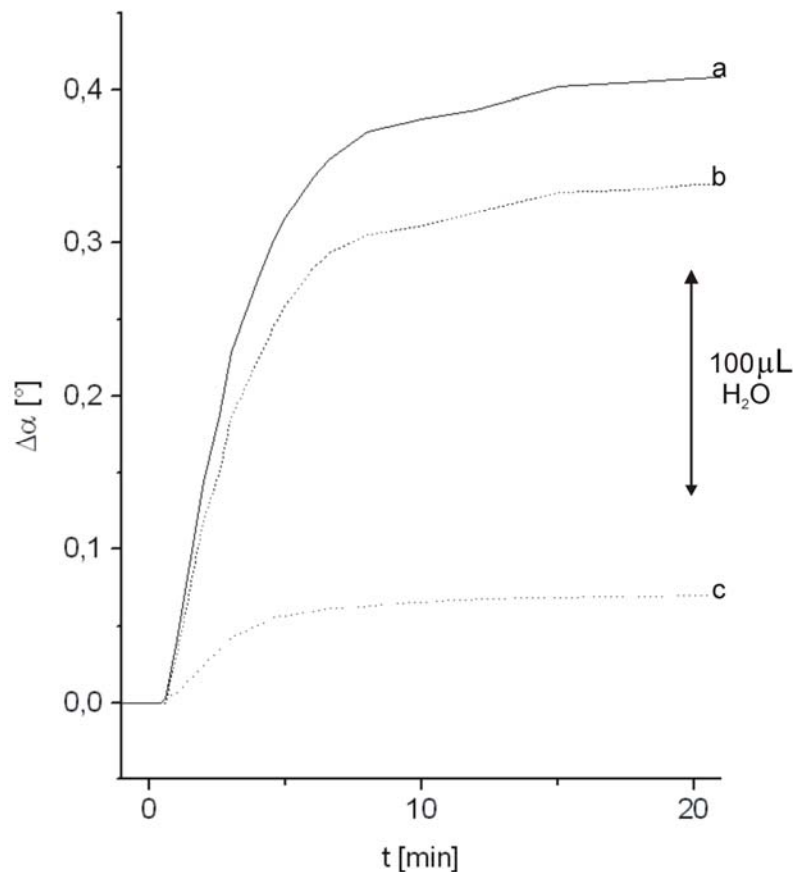


Abb. 35: Polarimetrische Bestimmung der Wasseraufnahme und der Abgabe diffusibler Zucker bei der Quellung lufttrockener Kiefernpollen in Dextranlösung oder Wasser. Zum Zeitpunkt Null wurden 150 mg Pollen, zu 10 mL einer (a) Dextran T70-Lösung ( $30 \text{ g L}^{-1}$ ,  $70000 \text{ g M}^{-1}$ ), oder (c) Wasser gegeben und die Änderung des Drehwinkels ( $\alpha$ ) aufgezeichnet; Kurve b ist die Differenz ( $b = a - c$ ) und gibt den Zeitverlauf der Wasseraufnahme an; Kalibrierung erfolgte durch Zugabe von  $100 \mu\text{L}$  Wasser (c) oder Dextranlösung (a).

Wässrige Pollenextrakte enthalten ca.  $1,6 \text{ mosmol}$  gelöste Teilchen pro Gramm Pollen (TM), d.h. in wassergesättigten Pollenkörnern liegt eine osmotische Konzentration von etwa  $1 \text{ osmol L}^{-1}$  bezogen auf das Zellwasser ( $1,6 \text{ mL g}^{-1}$ , vgl. Abb. 36) vor. Dies entspricht einem osmotischen Potential von etwa  $-2,4 \text{ MPa}$ .

Offensichtlich hatten sich die meisten Stoffe der lufttrockenen Sporoplasten während der ersten Minuten der Rehydratisierung noch nicht gelöst. Anderenfalls hätte der osmotische Effekt des PEG in der Anfangsphase der Quellung wesentlich niedriger ausfallen müssen.

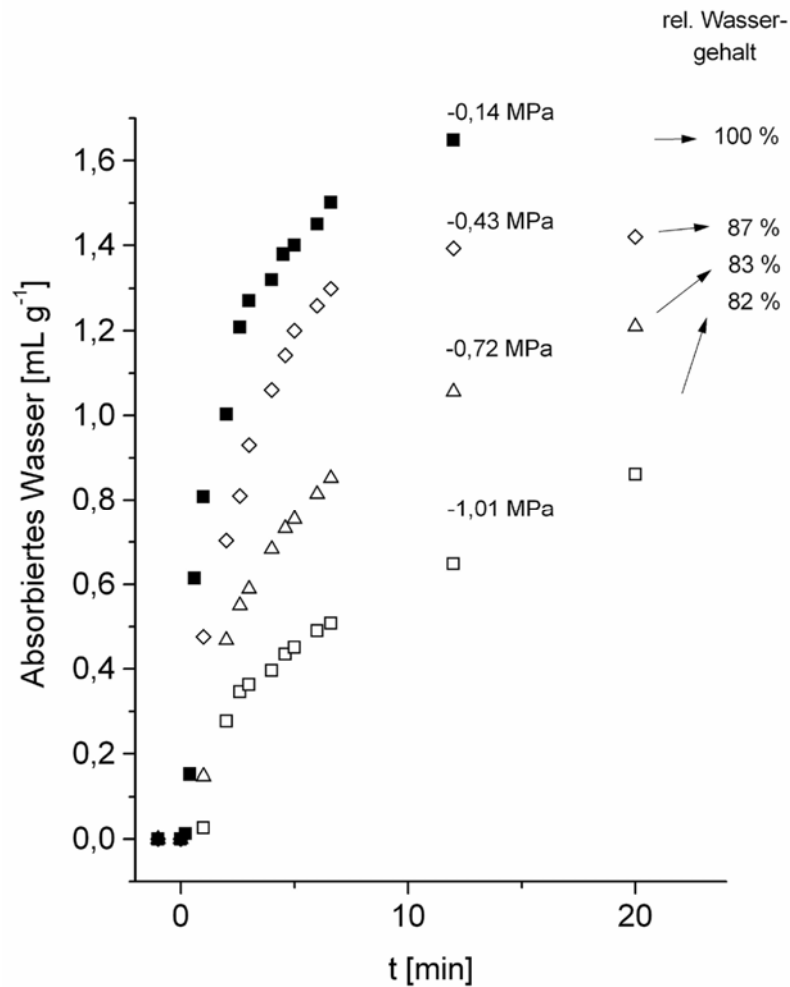


Abb. 36: Wasserabsorptionsraten und relative Wassergehalte von lufttrockenem Pollen, der in Calciumchlorid-Lösungen mit unterschiedlich hohem osmotischen Potential quellt. Zum Zeitpunkt Null wurden 150 mg Pollenkörner in Lösungen (10 mL, 20 mM  $\text{CaCl}_2$ ) gequellt, die unterschiedliche Konzentrationen (0,0; 0,1; 0,2 und 0,3 M) von Polyethylenglykol ( $200 \text{ g mol}^{-1}$ ) enthielten;  $\psi_{\pi}$  ist in MPa angegeben; Pfeile weisen auf den relativen Wassergehalt nach 2 h in der jeweiligen Lösung hin. Die Kurven wurden wie die Kurve b in Abb. 35 erhalten.

## 5 Diskussion

### 5.1 Physiologisch wichtige Materialeigenschaften des Sporopollenins in Beziehung zu möglichen biotechnologischen Anwendungen

Die funktionelle Bedeutung des Embryophyten-Sporopollenins lässt sich am besten vor dem Hintergrund der Verbreitungs-, Bestäubungs- und Befruchtungsbiologie der durch die trockene Atmosphäre verbreiteten Sporoplasten diskutieren.

Eine plausible Funktion von Exinen und Sporodermata ist der Schutz vor UV-B-Strahlung. Der hohe Anteil von Aromaten und Olefinen [Rozema et al., 2001] ist hierfür wesentlich. Weitere Besonderheiten des Sporopollenins, deren physiologische Bedeutung im folgenden diskutiert werden soll, gründen in den in dieser Arbeit untersuchten Wechselwirkungen mit Wasser oder wässrigen Lösungen (Benetzbarkeit, Quellung, hydraulische Leitfähigkeit, Ausschluss gelöster Teilchen) sowie in den mechanischen Eigenschaften (Dehnungsfestigkeit, Elastizitätsmodul).

#### 5.1.1 Absorptionsvermögen und Benetzbarkeit für unterschiedliche Flüssigkeiten

Aus den Ergebnissen (4.1.2.1) geht hervor, dass Sporopollenin polare Flüssigkeiten (Wasser, Alkohole, Aceton) weit stärker absorbiert als apolare (Benzin). Der amphiphile Charakter des Sporopollenins zeigt sich darin, dass das Festbettvolumen der Partikel in Ethanol höher als in Wasser ist (Abb. 22). Die im Vergleich mit Wasser höhere Affinität des Ethanols zum Sporopollenin zeigte sich auch an Hand des kleineren Grenzwinkels. Die Exine ist, ähnlich wie Glas, gut mit Wasser benetzbar ohne dabei zu quellen. Polare Funktionen wie Hydroxyl- und Aminogruppen sind für die Adhäsion und Absorption polarer Flüssigkeiten wichtig. Sporopollenin kann in heißem (80°C) 2-Aminoethanol [Jungfermann et al., 1997] gelöst werden. Das beste bekannte Quellungs- bzw. Lösungsmittel für Sporopollenin ist das cyclische Amin Piperidin [Ahlers et al., 2003].

Die starke Quellung bzw. Auflösung des Sporopollenins in diesen organischen Basen erklärt sich aus der in dieser Arbeit festgestellten hohen Konzentration von sauren Gruppen und dem amphiphilen Charakter, der aus der Kombination aliphatischer und aromatischer Reste mit polaren Gruppen (Hydroxyl- und Carboxylgruppen) folgt. Das Wasserabsorptionsvermögen von Sporopollenin in wässrigen Lösungen ist viel geringer ( $0,2 \text{ mL g}^{-1}$ , Tabelle 12; vgl. [Müller et al., 1993]) als das von Zellwandfragmenten ( $> 4 \text{ mL g}^{-1}$  TM, R. Ehwald, pers. Mitteilung 2001). Es ist dem reinen, kristallinen Cellulosefibrillen vergleichbar. Daher kann vermutet werden, dass die Sporopolleninstrukturen in der Exine sehr dicht sind und verhältnismäßig wenig Porenraum für die Absorption des Wassers zur Verfügung steht. Trotzdem ist die hydraulische Leitfähigkeit der Exine ähnlich hoch wie die einer pflanzlichen Plasmamembran (vgl. 4.1.3.3 u. [Lösch, 2001]). Die Dichte und Festigkeit des Polymergerüsts behindert offensichtlich das für hydrophile, stark gequollene Mikropartikel übliche Verkleben beim Trocknungsprozess. Vitaler Pollen und auch die Sporopolleninkapseln trocknen aus Wasser zu einem Pulver, dessen Partikel vereinzelt bleiben. Das Trocknen zum Pulver wird wahrscheinlich durch die Ornamentierung und Steifheit der Exine begünstigt. Die Mikrostrukturen verhindern, dass die Partikel beim Trocknen durch sehr dünne Wasserfilme auf einer größeren Fläche kohäsiv gegeneinander gepresst werden. Es wurde bereits erwähnt, dass der Grenzwinkel von Wasser am Sporopollenin deutlich größer als Null ist (4.1.2.1). Auch hierdurch wird das kohäsive Verkleben behindert. Die Bedeutung der materialbedingten Vereinzelung der Pollenkörner beim Trocknen ist nicht zu unterschätzen. Sie ist nicht auf anemophile Bestäubung beschränkt. Das Heteropolymer aus Isoprenoid- und Phenylpropanstoffwechsel setzte sich evolutionär bei der Eroberung des Landes bzw. des Luftraumes durch, weil es die Bildung eines Pulvers beim Trocknen der Sporen oder Pollen aus der apoplastischen Flüssigkeit in den Mikrosporangien begünstigt. Sowohl die gametophytischen Sporoplasten der Spermatophyta als auch die Sporen der Farne können sich aufgrund der geringen Quellbarkeit des Sporopollenins in wässrigen Lösungen (im Loculus des Tapetums) gut vereinzeln. Dies ermöglicht das Entstehen des feinen „Blütenstaubes“ aus dem „Brei“ in den Theken der unreifen Antheren. Die meisten anemophilen Pflanzen bilden Pollenkörner, die weitgehend dehydratisiert und pudrig sind [Hesse, 1981]. Die Ergebnisse dieser Arbeit lassen sich so deuten, dass hierfür die geringe Quellfähigkeit und die hohe Festigkeit des Sporopollenins ausschlaggebend sind. Abhängig von der Art des abgelagerten Pollenkitts bzw. Tryphins bei Angiospermen oder auch epicuticulären Wachsen bei Koniferen, kann die „Klebrigkeit“ der Pollenkörner genau eingestellt werden. Pollen kann so „gezielt“ als mehr oder weniger große Einheit bzw. Packet (z.B. das Pollinium bei Orchideen) verbreitet werden.

Hierbei ist auch eine weitere Funktion der porösen Struktur der Ectexine, analog der für angiosperme Pollen beschriebenen [Hesse, 1981] denkbar: neben der Ermöglichung eines begrenzten Stoffaustauschs, kann so das lysierte Tapetum (Plastiden, Lipidtröpfchen) in die Mikroporen der Exine



eindringen, ohne die Pollenkörner untereinander zu verkleben. Bei angiospermen Pollen wird dieser meist klebrige Überzug Pollenkitt genannt und dient den vielfältigen entomophilen Bestäubungsarten [Knoll, 1930]. Bei den Koniferen ist die Beschichtung der Pollen mit löslichen Bestandteilen wesentlich schwächer ausgeprägt. Er enthält bei den Luftsäcken von *Pinus* Verbindungen, die als epicuticuläre Wachse auf der Blattoberfläche vorkommen, in Mengen bis zu 3,5 Masseprozent der saccalen Exinefragmente [Niester et al., 1987; Wehling et al., 1989; Hagenberg et al., 1990]. Die Bedeutung der Wachse für die Benetzung der Sacci und der ganzen Pollenkörner mit Wasser ist nicht klar. Sie könnte in einer Herabsetzung der Adhäsion des Wassers bestehen. Allerdings ist ihr Effekt nicht so stark, dass vitale Pollenkörner beim Kontakt mit Wasser schlecht oder gar nicht benetzt würden. Wasser dringt, wie in dieser Arbeit gezeigt wurde, spontan in Trockenbetten reifer Kiefernpollen ein, die in Polypropylen-Röhrchen gepackt wurden. Bereits 1935 leiteten [Doyle und O'Leary] aus ihren Untersuchungen zur Bestäubung der Waldkiefer ab, dass die Pollenkörner leicht mit wässrigen Lösungen (wässriger Bestäubungstropfen) benetzbar sein müssen. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass reife Pollen wie auch die daraus präparierten Sporopolleninkapseln sich in der wässrigen Phase von Dispersionen Benzin/Wasser oder Butanol/Wasser verteilen.

Wie Titrationskurven zeigen, weist Sporopollenin eine relativ hohe Dichte negativer Ladungen auf. Da Sporopollenin nur C-, H- und O-Atome enthält, wird die Pufferwirkung ( $23 \mu\text{mol g}^{-1} \text{ TM}$ ) hauptsächlich von Carboxylgruppen (pH-Bereich 4-6) und phenolische Hydroxylgruppen (pH > 7) ausgeübt. Die benetzenden Flüssigkeiten gehen zum einen Wasserstoffbrückenbindungen mit Carboxyl- und Hydroxylgruppen ein. Sie solvatisieren zum einen die Festionen, und zum anderen benetzen sie leicht mit ihren aliphatischen Resten auch hydrophobe Bereiche, ohne dass hierbei, wie im Fall von Wasser, eine hohe Grenzflächenspannung überwunden werden muss.

Die o.g. Autoren [Doyle und O'Leary, 1935] bezeichneten als erste den bisaccaten Pollen von *Pinus* als „leicht benetzbar“. Ihre Vorstellung, dass eine Funktion der Sacci darin besteht, die Keimungsfurche (Leptoma) zum Nucellus hin zu orientieren, geht davon aus, dass die Exine mit Wasser benetzbar ist und die Luftsäcke dennoch gasgefüllt bleiben, so dass der Pollen flottiert und daher im Bestäubungstropfen direkt durch die Mikropyle in die Pollenkammer schwimmt (Abb. 4). Aufgrund der Tatsache, dass Kiefernpollen auf Wasser schwimmen, aber andere saccate Pollenkörner (*Phyllocladus*, *Picea orientalis*) nicht [Runions et al., 1999], führte zu der irreführenden Begriffswahl „non-wettable“ an Stelle von „non-sinkable“ Pollen [Tomlinson, 1994]. Gegen die Vorstellung einer Benetzungsbarriere spricht die Feststellung von Salter *et al.* [2002], dass alle Koniferenpollen beim Schwimmen die Wasseroberfläche durchdringen. Dagegen sprechen auch die im Abschnitt 4.1.2.1 dargestellten Ergebnisse dieser Arbeit. Die Ursache für den Auftrieb bestimmter saccater Pollenkörnern liegt nicht in einer vermeintlichen Hydrophobizität des Sporopollenins, sondern an der relativ geringen Größe der Poren im Tectum der Sexine (Abb. 7 und Abb. 8). Sinkfähiger Koniferenpollen besitzt dagegen große Poren in der saccalen Sexine [Salter et al., 2002]. Die Sacci des schwimmfähigen Pollen von *Pinus sylvestris* L. sind von Poren mit einem Durchmesser bis zu etwa  $0,2 \mu\text{m}$  durchbrochen. Fällt das Pollenkorn in Wasser, so füllen sich diese hydrophilen Mikroporen mit Wasser. Sie sind zu eng, als dass die nun im Saccus eingeschlossene Luft austreten könnte. Die in den Sacci eingeschlossene Luft wird erst unter Vakuuminfiltration durch Wasser verdrängt, wobei sich das Gas diffusiv im gasfreien Wasser auflöst. Für die methodische Zugänglichkeit der Pollenquellung war es entscheidend, dass die Luft in den Sacci leicht durch Schütteln in Siliconöl verdrängt werden konnte. Das Sinken trockener Kiefernpollenkörner in organischen Lösungsmitteln oder bei Zusatz von Detergenzien unter Vakuum ist kein Argument für hydrophobe Poren oder Wände. Es beruht auf der Tatsache, dass die hydrophoben Flüssigkeiten die Poren weit schlechter als Wasser benetzen und durch Gas leicht verdrängt werden können. Werden die Pollen zunächst kurz mit Wasser gewaschen und dann in dünnflüssiges Siliconöl überführt, bleibt die Luft in den Sacci eingeschlossen, so dass die Partikel schwimmen. Die Benetzbarkeit der Exine ist für den Bestäubungsprozess wichtig [Doyle und O'Leary, 1935]. Die Mikroporen im Tectum der saccalen Sexine stellen vermutlich Eintrittspforten für die Luft beim Trocknen der Pollen dar. Es ist anzunehmen, dass hohe Kohäsionsspannungen auftreten [Bohne et al., 2003], bevor sich in den Luftsäcken Gasblasen bilden. Hierdurch wird die Struktur der saccalen Exine mit dem perforierten, dünnen Tectum und den stützenden Columellae als Anpassung verständlich. Das Phänomen des Lufteinschlusses in den Sacci zeigt sich auch beim Suspendieren trockener Pollen in Ethanol, was sich durch die vergleichbare Benetzungsenergie von Ethanol und Wasser ohne weiteres erklären lässt. Die amphiphilen Eigenschaften des Sporopollenins sind möglicherweise dafür verantwortlich, dass Sporen von *Lycopodium* zur Stabilisierung von Öl-in-Wasser-Emulsionen und ölhaltigen Schäumen beitragen [Binks et al., 2005]. Die Anreicherung von Sporopollenin an der Phasengrenze von hydrophoben Flüssigkeiten und Wasser (Abb. 19) könnte zu einer sterischen Barriere für das Fusionieren der einzelnen Tröpfchen führen [Binks et al., 2005]. Wird die

Emulsion agitiert, so bildet sich ein außerordentlich stabiler Schaum. Auch im Fall der Bärlappsporen handelt es sich um Partikel mit amphipathischer Oberfläche, welche mit Wasser besser als mit Öl benetzbar sind. Die Ursache, dass sie an der Luft-Wasser-Grenzfläche oder der Öl-Wasser-Grenzfläche im Idealfall Monoschichten bilden, dürfte wie bei Kiefernpollen zumindest teilweise am Auftrieb der Partikel liegen, der in diesem Fall auf ihrem hohen Gehalt des Sporoplasten an gespeichertem Fett beruht. Das amphipathische Verhalten der Exinen und Sporodermata an der Phasengrenze könnte infolge der Hysteresis der Kontaktwinkel aufgrund (kleinräumiger) chemischer Heterogenität des Sporopollenins und/oder der Rauheit der Oberfläche (vgl. Lotus-Effekt) zustande kommen. Sporen und Pollen eignen sich gut als Stabilisator für Ö-in-Wasser-Emulsionen. Binks et al., [2005] beschreiben die Sporen von *Lycopodium clavatum* L. beim Quellen in Wasser als eher hydrophil als lipophil. Selbst relativ lipophile Sporopolleninoberflächen scheinen aber, wenn sie in Kontakt mit beidem, Wasser und Öl (bzw. Lipide) stehen, stärker hydrophil zu sein. Die so dargestellte amphipathische Natur der Sporopolleninoberfläche in Bezug auf Wasser und Öl ist wahrscheinlich von großer Bedeutung für die Bestäubung und die Pollenkeimung bei den (angiospermen) Arten, bei denen die Narbe von einem öligen Sekret bedeckt ist [Wolters-Arts et al., 1998; Wolters-Arts et al., 2002]. Hier ist Ölsekretion obligatorisch für Wasseraufnahme und Keimung. Die Autoren vermuten eine wasserleitende Funktion der Lipide, die physiko-chemisch schwer vermittelbar ist. Es ist eher anzunehmen, dass die Funktion der Lipide auf der Narbe, wie bei dem ersten Bestäubungstropfen der Koniferen [Owens et al., 2001], darin besteht, den trockenen Pollen aufzunehmen und zu immobilisieren. Dies ist wegen des lipophilen Charakters des amphipathischen Sporopollenins möglich. Erst wenn der Pollen auf die wasserfeuchte Zellwand an der nicht-cutinisierten Narbe trifft, kommt der stärker hydrophile Charakter des Sporopollenins zum Tragen. Die Pollenkörner bedecken sich mit einem flüssigen Wasserfilm, vergleichbar Abb. 19, der mit der Zellwand an der Narbenoberfläche zusammenhängt. So kann der Pollen Wasser absorbieren. Da der ganze Prozess im Schutze eines Ölfilms erfolgt, ist die Bestäubung auch in sehr trockener Atmosphäre möglich.

## 5.1.2 Permeabilität der Exine im Vergleich mit anderen Membranen

### 5.1.2.1 Die inaperturate Nexine der Kiefernpollen als hydrophile Porenmembran mit begrenzter Permeabilität für gelöste Salze und Nichtelektrolyte

Sporopolleninkapseln bisaccater Pollenkörner weisen, bezogen auf ihre Permeabilität, zwei distinkte Verteilungsräume auf (vgl. Abb. 3 u. Abb. 8): die Zentralkapsel, die von der mikroporösen Exine (Nexine) mit Ultrafiltereigenschaften begrenzt wird und die Luftsäcke (Sacci), welche von einer makroporösen Sexine mit Mikrofiltereigenschaften gebildet werden (s. 5.1.2.2).

Die Zentralkapsel ist aus zwei Exineschichten, welche eine unterschiedliche Funktion erfüllen, aufgebaut: eine innenliegende Trennschicht, die von der Nexine oder einem Teil davon (Fußschicht, und/oder Endexine) gebildet wird und einer außenliegenden Stützschiicht, die von der Sexine gebildet wird. Es ist naheliegend, die gefundenen Ultrafiltereigenschaften mit anderen physiologischen Barrieren zu vergleichen. Anders als bei hydrophilen Zellwänden, die für niedermolekulare Substanzen und Kolloide bis zu einer relativ scharfen Größengrenze (Stokes'sche Radien 2-5 nm) hoch permeabel sind [Woehlecke und Ehwald, 1995], stellt die Nexine bereits für Salze und Zucker eine starke Barriere dar. Der genannte Unterschied wird durch die unterschiedliche Grundstruktur verständlich (s. Einleitung Abb. 1 u. [Collinson et al., 1993; Rowley, 1996]). Die Permeabilität der Zellwände wird durch eine Gelstruktur aus Pectinstoffen und Glykoproteinen bestimmt, die in ein Netz von kristallinen Mikrofibrillen (Hemicellulose-Cellulose-Netz) eingebettet ist [Gibeaut und Carpita, 1994]. Die Permeabilität der Exine wird durch überwiegend enge Poren in einem dichten Feststoff bestimmt, wobei das Porenvolumen deutlich kleiner als das Feststoffvolumen ist und im Fall der untersuchten Exine etwa ein Fünftel des Gesamtvolumens der Sporopolleninmembran ausmacht (vgl. 4.1.2.3). Ähnlich wie cutinisierte, suberinisierte oder stark lignifizierte Zellwände oder Zellwandbereiche (z.B. Caspary-Streifen, Korklamellen, Cutinschichten) zeigt die Nexine der Kiefer eine ausgeprägte, nicht aber ideale Semipermeabilität für wässrige Lösungen niedermolekularer Stoffe. Sie ist, wie die genannten pflanzlichen Strukturen, hinsichtlich ihrer Permeabilitätseigenschaften zwischen Umkehrosmosemembran und Ultrafiltermembran einzuordnen (vgl. [Lösch, 2001]). Bei der Quellung der Pollenkörner in der Mikropyle können gelöste Teilchen, sofern sie in osmotisch wirksamen Konzentrationen im Bestäubungstropfen enthalten sind [Owens et al., 1998], die Wasseraufnahmerate effizient reduzieren und dies bereits bei relativ niedrigem RWC (s. Abb. 36).

Es ist allerdings bekannt, dass die Flüssigkeit an der Mikropyle durch Tautropfen oder Regen-

tropfen verdünnt werden kann, und die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass ungelagerter Pollen einer äußeren osmotischen Stabilisierung für das Überleben beim Quellvorgang nicht bedarf. Die chromatographische Methode (s. 4.1.1.4) erwies sich für die Untersuchung der Permeabilität der Membran von Mikrokapseln als sehr gut geeignet und könnte auch für markiertes Wasser, Schwefelwasserstoff, Wasserstoffperoxid und gelöste Gase eingesetzt werden. Die auffallend hohe Permeabilität ( $P$ ) für besonders kleine Moleküle, wie Methanol oder Wasser, wird durch eine große Anzahl/Dichte kleinster Poren bedingt.

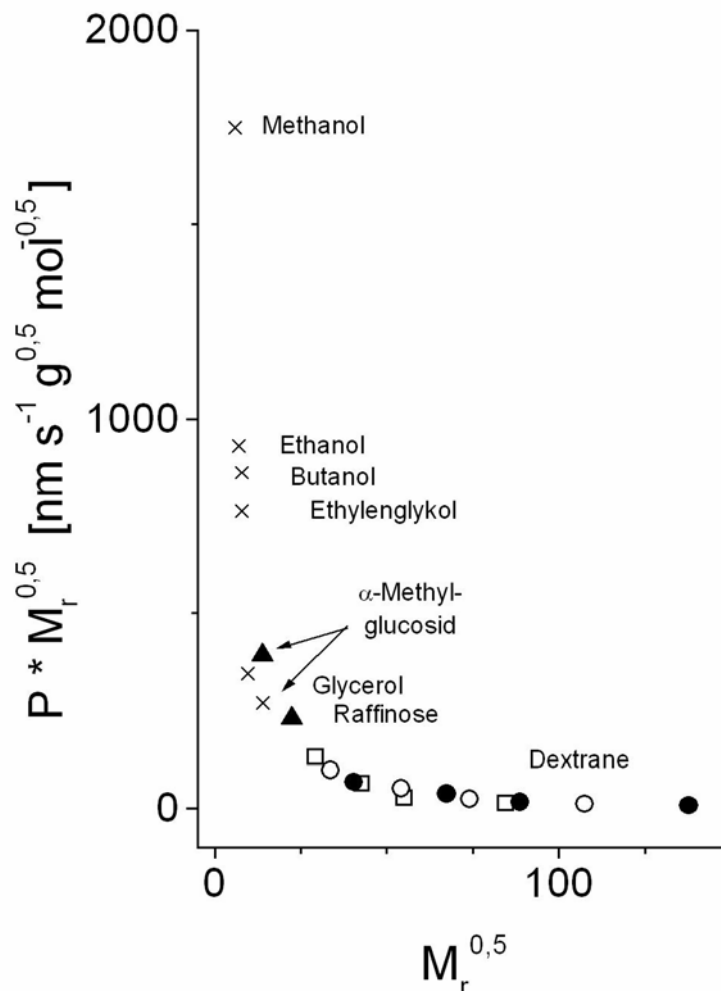


Abb. 37: Größenabhängigkeit der Permeabilitätskoeffizienten von polymeren Dextranen, Zuckern und niedermolekularen Stoffen an der Nexine der Zentralkapsel; Alkanole (x), Zucker (▲) und Dextranfraktionen ( $\gamma = 0,33$  ●;  $0,50$  ○;  $0,66$  ■; weitere Einzelheiten s. Abb. 14).

Bei dem Vergleich der Permeabilität für Ethanol und Methanol wird nicht nur erkennbar, dass die Permeation des Ethanols durch die Kleinheit der Poren behindert ist, sondern es kann sogar abgeleitet werden, dass für die Permeation der kleineren Methanolköle eine zusätzliche Fraktion sehr enger Poren wirksam wird, die für die Permeation nur etwas größerer Moleküle wie Ethanol, Ethylenglykol und Glycerol noch keinen großen Beitrag leisten können. Dies folgt daraus, dass die Abhängigkeit des Produktes  $P \cdot M_r^{0,5}$  von der Molekülgröße gerade bei den kleinsten Molekülen besonders stark ist (Abb. 37). Ein weiterer Indiz, dass die hohe hydraulische Leitfähigkeit ( $L_P$ ) auf der Abundanz sehr enger Poren beruht, ist der relativ hohe Reflexionskoeffizient für Salze. Die Größe des Radius dieser Poren liegt nicht über  $0,6$  nm und dürfte aus der Grundstruktur des (Hetero-) Polymers resultieren [Rowley, 1996].

Interessanterweise enthält die Exine auch größere Poren, deren Flächenanteil jedoch so gering ist, dass Kolloide im Kurzzeitexperiment als vollständig ausgeschlossen erscheinen. Sicher ist der

Flächenanteil größerer Poren (Radius 1-5 nm, vgl. 4.1.1.3) extrem klein, denn nach dem Hagen-Poiseuille'schen Gesetz ist  $L_p$  bei gleichem Flächenanteil der Poren dem Quadrat des Porenradius proportional. Eine stärkere Beteiligung der größeren Poren am Volumenfluss würde zu sehr viel kleineren Reflexionskoeffizienten für Salze und Zucker führen. Die hohe  $L_p$  ist möglicherweise von physiologischer Bedeutung. Einerseits ermöglicht sie einen ausreichend schnellen Übergang von der Anhydrobiose hin zu einem geregelten Stoffwechsel der hydratisierten Zelle. Andererseits stellt natürlich die Exine eine Barriere für den Volumenfluss dar, die in der Größenordnung der  $L_p$  von Biomembranen liegt [Lösch, 2001] und daher die Geschwindigkeit der Wasseraufnahme durchaus noch zusätzlich limitiert. Dies kann für das Überleben des Sporoplasten bei schneller Wasseraufnahme bedeutsam sein, weil die Geschwindigkeit, mit der sich die Oberfläche der Plasmamembran ausdehnen kann, begrenzt wird (s. 4.2.2). Besonders in der letzten Phase der Wasseraufnahme, wenn die Exine bereits voll entfaltet ist (vgl. Abb. 31), könnte die Kontrolle der Wasserabsorptionsgeschwindigkeit wichtig sein. Andererseits muss die in der Literatur verbreitete Hypothese [Heslop-Harrison, 1973; Crane, 1986; Raven, J.A., 2000], die Exine sei ein effektiver Schutz vor Wasserverlust, verworfen werden. Für Pollenkörner von Mais oder Kürbis, die im Gegensatz zu den hier untersuchten Kiefernpollen, mit Wassergehalten höher 30 % verbreitet werden, führt die hohe Wasserpermeabilität ( $L_p$  etwa drei Größenordnungen höher als bei *Pinus*) der dünnen Exine zu einer sehr kurzen Lebensdauer [Pacini, 2000; Aylor, 2003; Aylor et al., 2005]. Die Barrierefunktion der Exine ist sicher nicht bei allen Pollentypen von Bedeutung. So kommen porate und colpate Pollenkörner ohne sie aus. Die selektiv permeable Nexine begrenzt einen sehr kleinen apoplastischen Raum (Intine und periplasmatischen Raum). Ihre hohe Wasserleitfähigkeit in Verbindung mit einem hohen Reflexionskoeffizient für niedermolekulare Stoffe sorgt für die Aufrechterhaltung eines reduzierten osmotischen Potentials im Apoplasten, wenn die Pollenkörner Wasser aufnehmen, so dass eintretende Membrandurchbrüche, die möglicherweise bei der Flächenausdehnung auftreten (vgl. 5.1.3), leichter repariert werden können.

Während der Mikrosporogenese besteht die Notwendigkeit des Stoffaustauschs zwischen dem unreifen Pollenkorn und der umgebenen Flüssigkeit (vgl. Appendix in [Bohne et al., 2003]). Die Semi-permeabilität der reifen Exine steht hierzu nicht im Widerspruch; denn sie ist nicht ideal. Die Akkumulation von Reservestoffen (Stärke, Fett und Eiweiß) erfordert die Absorption von Zuckern und Aminosäuren - durch Exine, Intine - aus dem intra-loculären Apoplasten.

Die Mikrokapseln inaperturater Pollen eröffnen auf Grund ihrer Membraneigenschaften eine interessante pharmazeutisch-biotechnologische Applikation: die kontrollierte allmähliche Abgabe („controlled release“) von Wirkstoffen. Aus den Ergebnissen geht hervor, dass mittelgroße wasserlösliche Moleküle, z.B. Oligopeptide, stark verzögert aus den Kapseln permeieren sollten. Von Nachteil wäre allerdings, dass die Kapseln nicht schnell beladen werden könnten. Dieser Nachteil und auch die Einschränkung für den Bereich von Wirkstoffen mit relativ großen Molekülen, ist nicht bei lipidlöslichen, amphipathischen Stoffen mit hohem Öl-Wasser-Verteilungskoeffizienten gegeben. Die Kapseln können mit wirkstoffhaltigen fetten Ölen gefüllt werden, wobei Ethanol, Aceton oder deren Mischungen als Lösungsvermittler dienen. Die Wirkstoffe sollten hier langsam aus den unlöslichen Öltröpfchen in Abhängigkeit vom Verteilungskoeffizienten aus den Zentralkapseln freigesetzt werden. Der Einsatz dieser Kapseln in der Humanmedizin böte den Vorteil, dass Sporopollenin inert und wahrscheinlich unschädlich im Verdauungstrakt oder im Gewebe ist.

#### 5.1.2.2 Die Sexine der Luftsäcke als poröse Mikrofiltrationsmembran mit scharfer Größenausschlussgrenze und hoher Permeabilität für Proteine

Die Sacci umschließen 30 bis 40 % des Pollenvolumens. Sie werden nach außen durch eine poröse Membran, die Sexine, abgeschlossen. Die saccale Sexine stellt eine interessante Mikrofiltermembran dar. Hier liegt die Trennschicht, durch welche die scharfe Ausschlussgrenze für Riesenpolymere (DNA > 200 Basenpaare, K. Lerche, pers. Kommunikation 2006) und die hohe Permeabilität für Kolloide und sogar für lichtoptisch darstellbare Partikel bestimmt wird, außen. Sie wird vom Tectum gebildet, einer sehr dünnen mikroporösen Membran, die als Dach über den Columellae, der makroporösen alveolären Stüttschicht, liegt (vgl. Abb. 3 u. 4.1.1.2). Die Diffusion von Proteinen wird durch die saccale Exine behindert. Dies kann aus der Zunahme der Trennstufenhöhe  $\Delta H/\Delta v$  mit der linearen Fließgeschwindigkeit (vgl. Tabelle 7) rechnerisch abgeleitet werden. Die Zunahme ist nach der Gleichung ((11)) von Giddings [1965] der Halbwertszeit proportional. Der Vergleich der so berechneten Werte für ein Makromolekül wie Rinder-Serum-Albumin mit den Halbwertszeiten des diffusiven Austausches (Gleichung (5), [Crank, 1957]) für eine ungerührte Wasser-Sphäre mit den Dimensionen der Sacci ( $r = 9 \mu\text{m}$ ) ergibt für die gemessenen Werte eine Größe (ca. 0,5 s), die den Wert für den reinen Diffusionsfall (einige Millisekunden) um mindestens zwei Größenord-

nungen überschreitet. Dennoch erfolgt die Einstellung des Diffusionsgleichgewichtes selbst für Proteine außerordentlich schnell, so dass permeationschromatographische Trennungen mit hohen Flussraten möglich sind (s. Abb. 16). Die Erforschung möglicher biotechnologischer Anwendungen der Sporopolleninkapseln liegt zwar außerhalb des hier behandelten Themas, sie sollen aber trotzdem nicht unerwähnt bleiben. Bereits kleine Festbetten (< 1 mL) von Sporopolleninkapseln erlauben eine Größenfraktionierung und Deproteinierung von Viren und Hydrokolloiden (DNA, RNA) mit extrem großen Molekülgrößen [Ehwald et al., 2000; Ehwald, 2003]. Ein sogenannter „DNA-Isolations-Kit“ steht kurz vor der Marktreife (s. [Dr Lerche KG](#)).

Auch unter physiologischen Gesichtspunkten verleiht die 3 µm-mächtige Stüttschicht den Sacci eine hohe Stabilität und verhindert, in Kombination mit den Poren (Weite ca. 0,2 µm, vgl. Abb. 8), ein trocknungsbedingtes Kollabieren der Luftsäcke. Bei der darauf folgenden Wiederbefeuchtung in dem Bestäubungstropfen der Mikropyle dringt die Flüssigkeit, auch durch kleinste Poren, in die Sacci ein und benetzt deren Exine von innen und außen, aber die wenigen Mikroporen lassen, bei den hier untersuchten Arten, die eingeschlossene Luft nur unter Aufwendung großer Kräfte entweichen. Will man die Luftsäcke infiltrieren, muss man das in ihnen befindliche Gas auflösen (mehrfaches Evakuieren der Lösung).

Weiterführende vergleichende Untersuchungen an verschiedenen saccaten Koniferenpollen (*Pinus*, *Picea* etc.) hinsichtlich ihrer Trenngrenze mit Dextran T5000 (5000 kg mol<sup>-1</sup>) versprechen eine interessante technische Anwendungen zu finden und darüber hinaus Fragen zu einer vermeintlichen Vermeidung der Selbstbestäubung bei bestimmten Koniferenspezies zu beantworten [Runions et al., 1999; Salter et al., 2002].

### 5.1.3 Harmomegathie und ihre Bedeutung für die Rehydratation

Der Begriff Harmomegathie wurde von Wodehouse [1935] geprägt. Er wird vorwiegend von Palynologen genutzt und bezeichnet Volumen- und Formänderungen von Pollenkörnern vor Öffnung der Antheren bzw. Mikrosporangien (partielle Trocknung, Volumenabnahme) und bei der Wiederbefeuchtung auf dem Stigma oder der Mikropyle. Es handelt sich bei Harmomegathie um einen Komplex von funktionellen biomechanischen Vorgängen, die in starkem Maße durch die Materialeigenschaften des Sporopollenins der Exine, aber auch in ihrer Kooperation mit dem Sporoplasten und der Intine kontrolliert werden. Besonders die Biegungs- und Dehnungs-Elastizitäten sowie die Porenstruktur der Exine (osmotische Funktion, vgl. 5.1.2.1), das Vorliegen von Versteifungen und von gelenkartigen oder sehr dehnbaren Arealen ermöglichen definierte Formänderungen beim Trocknen, Quellen und Keimen. Die Bedeutung dieser Formänderungen wurde, z.T. spekulativ, im Zusammenhang mit dem Verbreitungsmechanismus [Crane, 1986], mit der Verzögerung der Verdunstung [Heslop-Harrison, 1979a; Heslop-Harrison, 1979b], mit der Orientierung des Pollens bei der Keimung in der Mikropyle [Owens et al., 1998; Salter et al., 2002], und anderen reproduktionsbiologisch wichtigen Prozessen diskutiert.

Wenig beachtet wurde die in dieser Arbeit hervorgehobene Rolle der Harmomegathie für die Kontrolle der Membran-Flächenausdehnung [Morris und Homann, 2001] bei schneller Rehydratation. Es ist vermutlich nicht nur für die hier untersuchten Pollenarten, sondern auch für viele aperturate Pollen besonders wichtig, dass die Plasmamembranen durch konkave Einkrümmung (unter den Poren, z.B. bei Betulaceen) oder Einfaltung (z.B. *Pinus*, s. Abb. 31) auch im getrockneten Pollenkorn ein kleines Volumen-Oberflächenverhältnis aufweisen. Hierdurch wird der Protoplast befähigt, seinen Wassergehalt rasch, sehr stark zu erhöhen, ohne dass sich die Fläche der Membran bei der Quellung stark ausdehnen müsste, wodurch die Geschwindigkeit der Quellung begrenzt wäre. Das große Potential zur Volumenvergrößerung ohne Flächenausdehnung ermöglicht daher eine rasche und trotzdem vitale Quellung des Pollenkorns.

In dieser Arbeit wurde erstmalig gezeigt, dass das bei der Kiefer das Überleben der Sporoplasten unter bestimmten Bedingungen (hohes Wasserpotential und Abwesenheit von Calciumionen in Verbindung mit Langzeitlagerung) durch zu schnelle Hydratation gefährdet ist (4.2.4). Es wurde auch deutlich gemacht, dass die Formänderung des Corpus die Membran-Flächenausdehnung in den ersten Minuten, in denen die Wasseraufnahmegeschwindigkeit besonders hoch ist, stark begrenzt. In zukünftigen Arbeiten sollte dieser Aspekt der Harmomegathie auch bei anderen Arten Beachtung finden.

## Literaturverzeichnis

- Abadie, M.; Hideux, M. und Rowley, J.R. (1987): Ultrastructural cytology of the anther - 2. proposal for a model of exine considering a dynamic connection between cytoskeleton, glycolemma and sporopollenin synthesis, *Annales des Sciences Naturelles-Botanique et Biologie Vegetale* 8 [1], Seite 1-16.
- Ahlers, F.; Thom, I.; Lambert, J.; Kuckuk, R. und Wiermann, R. (1999): H-1-NMR analysis of sporopollenin from *Typha angustifolia*, *Phytochemistry* 50 [6], Seite 1095-1098.
- Ahlers, F.; Bubert, H.; Steuernagel, S. und Wiermann, R. (2000): The nature of oxygen in sporopollenin from the pollen of *Typha angustifolia* L, *Zeitschrift für Naturforschung C* 55 [3-4], Seite 129-136.
- Ahlers, F.; Lambert, J. und Wiermann, R. (2003): Acetylation and silylation of piperidine solubilized sporopollenin from pollen of *Typha angustifolia* L, *Zeitschrift für Naturforschung C* 58 [1-2], Seite 807-811.
- Atkins, P. W. (1990): *Physikalische Chemie*, 1. Auflage, VCH, Weinheim Basel Cambridge New York, ISBN: 3-527-25913-9.
- Aylor, D.E. (2003): Rate of dehydration of corn (*Zea mays* L.) pollen in the air, *Journal of Experimental Botany* 54, Seite 2307-2312.
- Aylor, D.E.; Baltazar, B.M. und Schoper, J.B. (2005): Some physical properties of teosinte (*Zea mays* subsp. *parviglumis*) pollen, *Journal of Experimental Botany* 56 [419], Seite 2401-2407.
- Bailey, I.W. (1960): Some useful techniques in the study and interpretation of pollen morphology, *Journal of the Arnold Arboretum* 41, Seite 141-151.
- Bernards, M.A. (2002): Demystifying suberin, *Canadian Journal of Botany* 80, Seite 227-240.
- Binks, B.P.; Clint, J.H.; Mackenzie, G.; Simcock, C. und Whitby, C.P (2005): Naturally occurring spore particles at planar fluid interfaces and in emulsions, *Langmuir* 21 [18], Seite 8161-8167.
- Blackmore, S. (1990): Sporoderm homologies and morphogenesis in land plants, with a discussion of *Echinops sphaerocephala* (Compositae), Hesse, M. und Ehrendorfer, F., *Morphology, development, and systematic relevance of pollen and spores* Seite 1-12, Springer, Wien New York.
- Bohne, G.; Richter, E.; Woehlecke, H. und Ehwald, R. (2003): Diffusion barriers of tripartite sporopollenin microcapsules prepared from pine pollen, *Annals of Botany* 92 [2], Seite 289-297.
- Bohne, G.; Woehlecke, H. und Ehwald, R. (2005): Water relations of the pine

exine, *Annals of Botany* 96 [2], Seite 201-208.

- Braconnot, H. (1829): Recherches chimiques sur le pollen du *Typha latifolia* L., famille des typhacées, *Annales de Chimie et de Physique* 42, Seite 91-105.
- Brooks, J. und Shaw, G. (1968): Chemical structure of the exine of pollen walls and a new function for carotenoids in nature, *Nature* 219, Seite 532-533.
- Brunner, U. (1985): Ultrastrukturelle und chemische Zellwanduntersuchungen an Flechtenphycobionten aus 7 Gattungen der Chlorophyceae (Chlorophytina) unter besonderer Berücksichtigung sporopollenin-ähnlicher Biopolymere, Dissertation, Philosophische Fakultät II, Universität Zürich, Zürich.
- Cengeloglu, Y.; Mercimek, B.; Kara, H. und Ersoz, M. (1998): Sorption of target anions by ligand-exchange, *Journal of Applied Polymer Science* 69 [4], Seite 771-774.
- Collinson, M.E. ; Hemsley, A.R. und Taylor, W.A. (1993): Sporopollenin exhibiting colloidal organization in spore walls, *Grana* [Suppl. 1], Seite 31-39.
- Crane, P.R. (1986): Form and function in wind dispersed pollen, Blackmore, S. und Ferguson, I.K., *Pollen and spores: form and function* Seite 179-202, Academic Press, London.
- Crank, J. (1957): The mathematics of diffusion Seite 88-91, Oxford University Press, Glasgow.
- Dautzenberg, H.; Schuldt, U.; Lerche, D.; Woehlecke, H. und Ehwald, R. (1999): Size exclusion properties of polyelectrolyte complex microcapsules prepared from sodium cellulose sulphate and poly[diallyldimethylammonium chloride], *Journal of Membrane Science* 162, Seite 165-171.
- Delwiche, C.F.; Graham, L.E. und Thomson, N. (1989): Lignin-like compounds and sporopollenin in *Coleochaete* - an algal model for land plant ancestry, *Science* 245, Seite 399-401.
- Dickinson, H.G. und Sheldon, J.M. (1986): The generation of patterning at the plasma membrane of the young microspore of *Lilium*, Blackmore, S. und Ferguson, I.K., *Pollen and spores: form and function* Seite 137-149, Academic Press, London.
- Dominguez, E.; Mercado, J.A.; Quesada, M.A. und Heredia, A. (1999): Pollen sporopollenin - degradation and structural elucidation, *Sexual Plant Reproduction* 12 [3], Seite 171-178.
- Doyle, J. und O'Leary, M. (1935): Pollination in *Pinus*, *Scientific Proceedings of the Royal Dublin Society* 21 [20], Seite 181-191.
- Ducker, S.C.; Pettitt, J.M. und Knox, R.B. (1978): Biology of Australian

seagrasses: pollen development and submarine pollination in *Amphibolis antarctica* and *Thalassodendron ciliatum* (Cymodoceaceae), Australian Journal of Botany 26 [3], Seite 265-285.

Ehwald, R.; Dvorak, B. und Göring, H. (1973a): Anwendungsmöglichkeiten einer neuen registrierenden Methode zur kontinuierlichen Messung der Wasseraufnahme durch pflanzliche Gewebe, Biochemie und Physiologie der Pflanzen 164, Seite 88-97.

Ehwald, R.; Sammler, P. und Göring, H. (1973b): Different affinities of the  $\alpha$ - and  $\beta$ -anomers of D-glucose, D-mannose and D-xylose for the glucose uptake system of Baker's yeast, Folia Microbiologica 18, Seite 172-177.

Ehwald, R.; Fuhr, G.; Olbrich, M.; Göring, H.; Knösche, R. und Kleine, P. (1989): Chromatography based on membrane separation with vesicular packing material, Chromatographia 28 [11-12], Seite 561-564.

Ehwald, R.; Woehlecke, H. und Titel, C. (1992): Cell wall microcapsules with different porosity from suspension cultured *Chenopodium album*, Phytochemistry 31 [9], Seite 3033-3038.

Ehwald, R.; Woehlecke, H. und Lerche, D. (2000): Mikrokapseln aus Sporopollenin, Verfahren zu ihrer Herstellung und Anwendung, Int. Cl., FR-Germany, Lerche, D., DE 199 02 724 A1, 199 02 724.2, 5, 19.01.1999, B 01 D15/08, 6050

Ehwald, R.; Bohne, G.; Richter, E.; Woehlecke, H. und Lerche, D. (2002a): Permeability of sporopollenin capsules prepared from birch and pine pollen, COST 840 & X. International BRG Workshop on Bioencapsulation, Prag.

Ehwald, R.; Bohne, G.; Richter, E.; Woehlecke, H. und Lerche, D. (2002b): Functional properties and the technical potential of sporopollenin capsules/Bionik - Pflanzen als Ideengeber der Technik, Deutsche Botanikertagung, Freiburg i. Br.

Ehwald, R. (2003): Trägerpartikeln für die Chromatographie auf der Grundlage von Mikrokapseln, Verfahren zu ihrer Herstellung und ihre Anwendung, Int. Cl., Germany, B 01 J20/24, 9, 13.03.2003, 103 12 128.5, 6060, DE 103 12 128 A1, LUM GmbH, 12489 Berlin, DE.

Erdtman, G. (1952): Pollen morphology and plant taxonomy, Ålmqvist & Wiksell, Stockholm, Schweden.

Erdtman, G. (1960): The acetolysis method - a revised description, Svensk Botanisk Tidskrift 54, Seite 561-564.

Ersoz, M.; Vural, U.S. und Yildiz, S. (1995): Sorption of aromatic-amines on a new ligand exchanger of sporopollenin-bound  $\text{Co}^{2+}$  ion, Separation Science and Technology 30 [18], Seite 3555-3566.



- Fleischer, A. und Ehwald, R. (1995): The free space of sugars in plant tissues — external film and apoplastic volume, *Journal of Experimental Botany* 46 [287], Seite 647-654.
- Gastaminza Lasarte, G. (2003): Alergia a polen de pino, *Alergologia e Immunologia Clinica* 18 [3], Seite 70-74.
- Gibeaut, D.M. und Carpita, N.C. (1994): Biosynthesis of plant cell wall polysaccharides, *FASEB Journal* 8 [12], Seite 904-915.
- Giddings, J.C. (1965): Dynamics of chromatography (in three parts) - Part I, principles and theory, Giddings, J.C. und Keller, R.A., *Chromatographic science - a series of monographs* 1 Seite 323, Marcel Dekker, Inc., Salt Lake City, Utah, USA.
- Gubatz, S.; Rittscher, M.; Meuter, A.; Nagler, A. und Wiermann, R. (1993): Tracer experiments on sporopollenin biosynthesis - an overview, *Grana* [Suppl. 1], Seite 12-17.
- Guilford, W.J.; Schneider, D.M.; Labovitz, J. und Opella, S.J. (1988): High resolution solid state  $^{13}\text{C}$  NMR spectroscopy of sporopollenins from different plant taxa, *Plant Physiology* 86 [1], Seite 134-136.
- Hagenberg, S.; Wehling, K. und Wiermann, R. (1990): Normal-alkanes - common surface constituents of pollen from gymnosperm and angiosperm, *Zeitschrift für Naturforschung C* 45 [11-1], Seite 1090-1092.
- Harris, R.M. und German, D.F. (1985): The incidence of pine pollen reactivity in an allergic atopic population, *Annals of Allergy* 55, Seite 678-679.
- Hemsley, A.R.; Barrie, P. J.; Chaloner, W.G. und Scott, A.C. (1993): The composition of sporopollenin and its use in living and fossil plant systematics, *Grana* [Suppl. 1], Seite 2-11.
- Hemsley, A.R.; Scott, A.C.; Barrie, P.J. und Chaloner, W.G. (1996): Studies of fossil and modern spore wall biomacromolecules using C-13 solid state NMR, *Annals of Botany* 78 [1], Seite 83-94.
- Hemsley, A.R.; Vincent, B.; Collinson, M. und Griffiths, P.C. (1998): Simulated self-assembly of spore exines, *Annals of Botany* 82 [1], Seite 105-109.
- Heslop-Harrison, J. (1968): Anther carotenoids and the synthesis of sporopollenin, *Nature* 220, Seite 605.
- Heslop-Harrison, J. (1973): The pollen wall: structure and development, Heslop-Harrison, J., *Pollen: development and physiology* Seite 75-98, Butterworths, London.
- Heslop-Harrison, J. (1979a): Pollen walls as adaptive systems, *Annals of the Missouri Botanical Garden* 66 [4], Seite 813-829.

- Heslop-Harrison, J. (1979b): An interpretation of the hydrodynamics of pollen, *American Journal of Botany* 66 [6], Seite 737-743.
- Hesse, M. (1981): The fine-structure of the exine in relation to the stickiness of angiosperm pollen, *Review of Palaeobotany and Palynology* 35 [1], Seite 81-92.
- Hesse, M. (1991): Cytology and morphogenesis of pollen and spores, *Progress in Botany* 52, Seite 19-34.
- Jäschke, A.; Cech, D. und Ehwald, R. (1991): Chromatographic fractionation of nucleic acids using microcapsules made from plant cells, *Journal of Chromatography A* 585 [1], Seite 57-65.
- John, J.J. (1814): Ueber den Befruchtungsstaub, nebst einer Analyse des Tulpenpollens, *Journal für Chemie und Physik* 12 [3], Seite 244-252.
- Jungfermann, C.; Ahlers, F.; Grote, M.; Gubatz, S.; Steuernagel, S.; Thom, I.; Wetzels, G. und Wiermann, R. (1997): Solution of sporopollenin and reaggregation of a sporopollenin-like material - a new approach in the sporopollenin research, *Journal of Plant Physiology* 151 [5], Seite 513-519.
- Khanduri, V.P. und Sharma, C.M. (2000): Development of groups of male strobili, anthesis and microsporangium dehiscence in *Pinus roxburghii*, *Grana* 39 [4], Seite 169-174.
- Kleine, R.; Woehlecke, H. und Ehwald, R. (1992): Application of vesicle chromatography in protein purification, *Acta Biotechnologica* 12 [3], Seite 243-253.
- Knoll, F. (1930): Über Pollenkitt und Bestäubungsart, *Zeitschrift für Botanik* 23, Seite 609-675.
- Kroken, S.B.; Graham, L.E. und Cook, M.E. (1996): Occurrence and evolutionary significance of resistant cell walls in charophytes and bryophytes, *American Journal of Botany* 83 [10], Seite 1241-1254.
- Lerche, D.; Sobisch, T.; Woehlecke, H. und Ehwald, R. (2002): A new method to characterise mechanical behaviour of nano- and microparticles / Cell Physiology and Interactions of Biomaterials and Matrices, COST 840 & X. International BRG Workshop on Bioencapsulation, Prag.
- Linskens, H.F. (1964): Pollen physiology, *Annual Review of Plant Physiology* 15, Seite 255-270.
- Lösch, R. (2001): Wasserhaushalt der Pflanzen, 1. Auflage, Seite 88, Quelle & Meyer, Wiebelsheim.
- Marcos, C.; Rodriguez, F.J.; Luna, I.; Jato, V. und Gonzales, R. (2001): *Pinus* pollen aerobiology and clinical sensitization in northwest Spain, *Annals of*

- Meier-Melikyan, N.R. und Tokarev, P.I. (2004): Peculiarities of pollen grain structure of some Pinaceae on the base of electron microscopy investigations, BMSN Biological series 109 [1], Seite 19-21.
- Meuter-Gerhards, A.; Riegert, S. und Wiermann, R. (1999): Studies on sporopollenin biosynthesis in *Cucurbita maxima* (Duch.) - II - the involvement of aliphatic metabolism, *Journal of Plant Physiology* 154 [4], Seite 431-436.
- Moore, P.D.; Webb, J.A. und Collinson, M.E. (1991): Pollen analysis, 2. Auflage, Blackwell Scientific Publications, Oxford, ISBN: 0-632-02176-4.
- Morris, C.E. und Homann, U. (2001): Cell surface area regulation and membrane tension, *Journal of Membrane Biology* 179, Seite 79-102.
- Müller, T.; Küchler, L.; Fuhr, G.; Schnelle, T. und Sokirko, A. (1993): Dielektrische Einzelzellspektroskopie an Pollen verschiedener Waldbaumarten — Charakterisierung der Pollenvitalität, *Silvae Genetica* 42 [6], Seite 311-322.
- Niester, C.; Gülz, P.-G. und Wiermann, R. (1987): Epicuticular waxes from exine material of pine pollen, *Zeitschrift für Naturforschung C* 42 [7-8], Seite 858-862.
- Niklas, K.J. (1992): Plant biomechanics: an engineering approach to plant form and function, The University of Chicago Press, Chicago & London, ISBN: 0-226-58641.
- Owens, J.N.; Takaso, T. und Runions, C.J. (1998): Pollination in conifers, *Trends in Plant Science* 3 [12], Seite 479-485.
- Owens, J.N.; Catalano, G.L. und Bennett, J.S. (2001): The pollination mechanism of western white pine, *Canadian Journal of Forest Research* 31 [10], Seite 1731-1741.
- Pacini, E.; Franchi, G.G. und Hesse, M. (1985): The tapetum - its form, function and possible phylogeny in Embryophyta, *Plant Systematics and Evolution* 149 [3-4], Seite 155-185.
- Pacini, E.; Franchi, G.G. und Ripaccioli, M. (1999): Ripe pollen structure and histochemistry of some gymnosperms, *Plant Systematics and Evolution* 217 [1-2], Seite 81-99.
- Pacini, E. (2000): From anther and pollen ripening to pollen presentation, Dafni, A.; Hesse, M. und Pacini, E., *Pollen and pollination*, Springer, Wien New York, ISBN: 0378-2697.
- Piffanelli, P.; Ross, J.H.E. und Murphy, D.J. (1998): Biogenesis and function of the lipidic structures of pollen grains, *Sexual Plant Reproduction* 11 [2], Seite

- Punt, W.; Blackmore, S.; Nilsson, S. und Le Thomas, A. (1994): Glossary of pollen and spore terminology, 2. Auflage, Hoen, P., LPP Foundation, Utrecht, Niederlande. URL: <http://www.bio.uu.nl/~palaeo/glossary/glos-int.htm>
- Raven, J.A. (2000): Land plant biochemistry, Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences 355, Seite 833-846.
- Raven, P.H.; Evert, R.F. und Curtis, H. (2000): Biologie der Pflanzen, 3. Auflage, Walter de Gruyter, Berlin New York.
- Rowley, J.R. und Dahl, A.O. (1982): A similar substructure for tapetal surface and exine "tuft"-units, Pollen et Spores 24, Seite 5-8.
- Rowley, J.R.; Gabarayeva, N.I. und Walles, B. (1992): Cyclic invasion of tapetal cells into loculi during microspore development in *Nymphaea colorata* (Nymphaeaceae), American Journal of Botany 79 [7], Seite 801-808.
- Rowley, J.R. (1995): Are the endexines of pteridophytes, gymnosperms and angiosperms structurally equivalent, Review of Palaeobotany and Palynology 85 [1-2], Seite 13-34.
- Rowley, J.R. (1996): Chapter 14D - Exine origin, development and structure in pteridophytes, gymnosperms and angiosperms, Jansonius, J. und McGregor, D.C., Palynology: principles and applications 1 Seite 443-462, American Association of Stratigraphic Palynologists Foundation.
- Rowley, J.R.; Skvarla, J.J. und Walles, B. (1999): Microsporogenesis in *Pinus sylvestris* - VII - Exine expansion and tapetal development, Taiwania 44 [3], Seite 325-344.
- Rowley, J.R.; Skvarla, J.J. und Walles, B. (2000a): Microsporogenesis in *Pinus sylvestris* - VI - exine and tapetal development during the tetrad period, Nordic Journal of Botany 20, Seite 67-87.
- Rowley, J.R.; Skvarla, J.J. und Walles, B. (2000b): Microsporogenesis in *Pinus sylvestris* L - VIII - tapetal and late pollen grain development, Plant Systematics and Evolution 225, Seite 201-224.
- Rozema, J.; Broekman, R.A.; Blokker, P.; Meijkamp, B.B.; de Bakker, N.; van de Staij, J.; van Beem, A.; Ariese, F. und Kars, S.M. (2001): UV-B absorbance and UV-B absorbing compounds (para-coumaric acid) in pollen and sporopollenin: the perspective to track historic UV-B levels, Journal of Photochemistry and Photobiology B 62 [1-2], Seite 108-117.
- Runions, C.J.; Rensing, K.H.; Takaso, T. und Owens, J.N. (1999): Pollination of *Picea orientalis* (Pinaceae) - saccus morphology governs pollen buoyancy, American Journal of Botany 86 [2], Seite 190-197.

- Salter, J.; Murray, B.G. und Braggins, J.E. (2002): Wettable and unsinkable: the hydrodynamics of saccate pollen grains in relation to the pollination mechanism in the two New Zealand species of *Prumnopitys* Phil. (Podocarpaceae), *Annals of Botany* 89 [2], Seite 133-144.
- Schneider, W.B. und Vollmer, M. (2005): Experimental simulations of pollen coronas, *Applied Optics* 44 [27], Seite 5746-53.
- Shaw, G. (1971): The chemistry of sporopollenin, Brook, J.; Grant, P.R.; Muir, R.D.; van Gijzel, P. und Shaw, G., *Sporopollenin* Seite 305-350, Academic Press, London New York.
- Shivanna, K.R. und Heslop-Harrison, J. (1981): Membrane state and pollen viability, *Annals of Botany* 47, Seite 759-770.
- Shivanna, K.R. und Rangaswamy, N.S. (1992): *Pollen biology - a laboratory manual*, Springer, Berlin Heidelberg, ISBN: 3-540-55170-0.
- Singh, J. und Devi, S. (1992): Development of fern sporangia: a fluorescence microscopy study, *Biotechnic & Histochemistry* 67 [5], Seite 261-264.
- Skvarla, J.J. und Larson, D.A. (1966): Fine-structural studies of *Zea mays* pollen - I - cell membranes and exine ontogeny, *American Journal of Botany* 53, Seite 1112-1125.
- Southworth, D. (1974): Solubility of pollen exines, *American Journal of Botany* 61, Seite 36-44.
- Southworth, D. (1986): Substructural organization of pollen exines, Blackmore, S. und Ferguson, I.K., *Pollen and spores: form and function* Seite 61-69, Academic Press, London.
- Stanley, R.G. und Linskens, H.F. (1985): *Pollen - Biologie, Biochemie, Gewinnung und Verwendung*, Urs Freund, Greifenberg/Ammersee, Deutschland, ISBN: 3-924-73300-7.
- Straka, H. (1975): *Pollen- und Sporenkunde*, Straka, H., *Grundbegriffe der modernen Biologie* Vol. 13, Gustav Fischer-Verlag, Stuttgart.
- Talyzina, N.M. (1998): Fluorescence intensity in early Cambrian Acritarchs from Estonia, *Review of Palaeobotany and Palynology* 100 [1-2], Seite 99-108.
- Thom, I.; Grote, M.; Abraham-Peskir, J. und Wiermann, R. (1998): Electron and X-Ray microscopic analyses of reaggregated materials obtained after fractionation of dissolved sporopollenin, *Protoplasma* 204 [1-2], Seite 13-21.
- Tomlinson, P.B. (1994): Functional-morphology of saccate pollen in conifers with special reference to Podocarpaceae, *International Journal of Plant Sciences* 155 [6], Seite 699-715.

- Tomlinson, P.B. (2000): Structural features of saccate pollen types in relation to their functions, Harley, M.M.; Morton, C.M. und Blackmore, S., Pollen and spores: morphology and biology Seite 147-162, Royal Botanic Gardens, Kew.
- Vural, U.S.; Ersoz, M. und Pehlivan, E. (1995): Ligand sorption kinetics of aromatic-amines on new ligand-exchanger sporopollenin in cobalt ion form, Journal of Applied Polymer Science 58 [13], Seite 2423-2428.
- Walles, B. und Rowley, J.R. (1982): Cell differentiation in microsporangia of *Pinus sylvestris* with special attention to the tapetum. I. The pre- and early meiotic periods, Nordic Journal of Botany 2, Seite 53-70.
- Wehling, K.; Niester, C.; Boon, J.J.; Willemse, M.T.M. und Wiermann, R. (1989): p-Coumaric acid - a monomer in the sporopollenin skeleton, Planta 179 [3], Seite 376-380.
- Wiermann, R. und Gubatz, S. (1992): Pollen wall and sporopollenin, International Review of Cytology - a Survey of Cell Biology 140, Seite 35-72.
- Wiermann, R.; Ahlers, F. und Schmitz-Thom, I. (2001): Sporopollenin, Hofrichter, M. und Steinbüchel, A., Biopolymers Vol. 1. Seite 209-229, Wiley-VCH, Weinheim.
- Wilke, T. (2002): Eigenschaften der Exinen von Pollen windblütiger Pflanzen, Staatsexamen, Institut für Bioogie / AG Zellbiologie, Humboldt Universität, Berlin.
- Wilmesmeier, S.; Steuernagel, S. und Wiermann, R. (1993): Comparative FTIR and C-13 CP/MAS NMR spectroscopic investigations on sporopollenin of different systematic origins, Zeitschrift für Naturforschung C 48 [9-10], Seite 697-701.
- Wilmesmeier, S. und Wiermann, R. (1995): Influence of EPTC (s-ethyl-dipropylthiocarbamate) on the composition of surface waxes and sporopollenin structure in *Zea mays*, Journal of Plant Physiology 146 [1-2], Seite 22-28.
- Wittborn, J.; Rao, K.V.; El-Ghazaly, G. und Rowley, J.R. (1998): Nanoscale similarities in the substructure of the exines of *Fagus* pollen grains and *Lycopodium* spores, Annals of Botany 82, Seite 141-145.
- Wodehouse, R.P. (1935): Pollen grains: their structure, identification and significance in science and medicine, McGraw-Hill, New York.
- Woehlecke, H. und Ehwald, R. (1995): Characterization of size-permeation limits of cell walls and porous separation materials by high-performance size-exclusion chromatography, Journal of Chromatography A 708, Seite 263-271.
- Woehlecke, H.; Lerche, D. und Ehwald, R. (2002): Sporopollenin microcapsules -

application for chromatography and encapsulation, COST 840 & X.  
International BRG Workshop on Bioencapsulation, Prag.

Wolters-Arts, M.; Lush, W.M. und Mariani, C. (1998): Lipids are required for directional pollen-tube growth, *Nature* 392, Seite 818-821.

Wolters-Arts, M.; van der Weerd, L.; van Aelst, A.C.; van der Weerd, J.; van As, H. und Mariani, C. (2002): Water-conducting properties of lipids during pollen hydration, *Plant, Cell and Environment* 25, Seite 513-519.

Zetzsche, F. und Huggler, K. (1928): Untersuchungen über die Membran der Sporen und Pollen - I - 1. *Lycopodium clavatum* L, *Justus Liebig's Annalen der Chemie* 461, Seite 89-108.

Zetzsche, F. und Vicari, H. (1931): Untersuchungen über die Membran der Sporen und Pollen - III - 2. *Picea orientalis*, *Pinus silvestris* L., *Corylus avellana* L, *Helvetica Chimica Acta* 14, Seite 62-67.

Zetzsche, F.; Kalt, P.; Liechti, J. und Ziegler, E. (1937): XI. Mitteilung über die Membran der Sporen und Pollen, *Journal für praktische Chemie N. F.* 148, Seite 267-286.

## Anhang

### Abbildungsverzeichnis

- Abb. 1: Elektronenmikroskopisches Bild eines Exinefragments nach Erosion und hypothetisches Modell der Exine. (a) Die Erosion des acetylierten Fragments erfolgte mit 2-Aminoethanol; mit (a) sind abgebrochene Verbindungen (5-10 nm) zu Nachbarsträngen bezeichnet [Southworth, 1986]; (b-e) hypothetisches Modell der Exine, nach Rowley & Flynn [Abadie et al., 1987], (b) röhrenförmige Elemente einer Untereinheit, (c) Seitenansicht einer Exine-Einheit „Tuft“, ca. 70 nm Durchmesser, (d) Sicht auf die Kernzone eines „Tufts“ mit Untereinheiten (1-5) und Verbindungen (B), (e) Schema einer juvenilen Exine, nach Polymerisation des Sporopollenins auf der Glykocalyx.....11
- Abb. 2: Aufbau des reifen Kiefernpollens. Die Wandstrukturen (Exine, innere und äußere Intine) sowie Calloseablagerungen sind unterschiedlich schraffiert (Pinus sylvestris, nach Martens & Waterkeyn, 1962 in [Stanley und Linskens, 1985] S. 152). .....13
- Abb. 3: Schematischer Aufbau der Kieferexine. Die äußeren Sporopollenin-Strata der Ectexine (Sexine) sind von der Fußschicht abgelöst und formen so die Sacci. Die Zentralkapsel entspricht dem Corpus nach erfolgter Präparation. ....13
- Abb. 4: Anhaftende Kiefernpollen an der Mikropyle. (1) Adaxiale Sicht auf die Samenanlage mit Teilen der Deck- und Samenschuppen. (2) Abaxiale Sicht auf die Mikropyle derselben Samenanlage. (3) Freigelegte Samenanlage mit Pollenkörnern in der Vertiefung des Nucellus. Abbildung, verkleinert, entnommen aus [Doyle und O'Leary, 1935].....14
- Abb. 5: Luftgetriebenes Kreislaufsystem für wässrige Lösungen von optisch aktiven Substanzen, deren Konzentration polarimetrisch registriert wird. (1) thermostatisiertes und belüftetes Inkubationsgefäß, das die Kiefernexinen aufnimmt, (2) zylindrischer Partikelfilter, welcher derart eingepasst ist, dass er den geriffelten Drainagebereich sowie den Ringkanal vor dem Filtratauslass bedeckt, (3) thermostatisierte Küvette (1 mL). .....20
- Abb. 6: Modellskizze für die morphometrische Untersuchung der ellipsoiden Zentralkapseln. Die dargestellten Durchmesser a, b und c (Werte in Tabelle 2) wurden an lichtmikroskopischen Aufnahmen der sedimentierten Kapseln (in Aufsicht oder Seitenansicht) bei definiertem Abbildungsmaßstab mit einem Messschieber vermessen. Dabei erhält man die beiden kleinen Durchmesser b und c entweder von Seitenansichten (b, oben) mit dem distalen Pol nach unten, oder von Aufsichten (c, unten) und den langen Durchmesser (a) aus beiden Ansichten. ....25
- Abb. 7: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von ganzen, getrockneten Sporopolleninkapseln und Exine-Gefrierschnitten von Kiefernpollen (*P. sylvestris*). (A, B) intakte getrocknete Kapseln, (C-D, F) Gefrierschnitte durch die Exine, (E, G) vergrößerte Ansicht der Oberfläche der saccularen Exine. Die Oberflächenskulptur der alveolaren Ectexine ist an den Sacci gröber als an der Zentralkapsel (B). Während die Innenansicht der Luftsäcke die Wabenstruktur der Columellae zeigt, erscheint diejenige der Endexine in der Zentralkapsel glatt (C, D). Die wabenartige, nach innen offene Stützstruktur (Columellae) und die Dachsicht (Tectum) der Sexine an den Sacci ist in F erkennbar. Das Tectum weist zahlreiche feine Poren auf, deren Weite unter 1 µm liegt (E, G). Die Kapseln oder 20 µm dicke Gefrierbruchscheiben sind mit 10 nm Goldpartikeln besputtert. Die Bilder wurden mit einem Leica REM-S360 gemacht. ....26
- Abb. 8: Verteilung von niedermolekularen Farbstoffen, gefärbten Polymeren und Partikeln in Sporopolleninkapseln. (A) Carboxyfluorescein ( $c = 0,01 \text{ g L}^{-1}$ ,  $M_r = 376,3 \text{ g mol}^{-1}$ ) permeiert durch die Exine der Zentralkapsel (3 h). (B, C) FITC-Dextran ( $c = 0,4 \text{ g L}^{-1}$ ,  $M_r = 282 \text{ kDa}$ ) dringt nur in zerstörte Kapseln ein, intakte Zentralkapseln schließen FITC-Dextran aus (3 h). (D) FITC-markierte Submikrometerpartikel mit Durchmessern bis ca. 0,2 µm permeieren in die Sacci (Latexpartikel,  $c = 0,26 \text{ mg L}^{-1}$ , 15 min). (E) Mikrometerpartikel mit Durchmessern von 1,0 µm werden auch von den Sacci ausgeschlossen (FITC-markierte Latexpartikel,  $c = 0,11 \text{ mg L}^{-1}$ , 3 h). Kapseln (*P. sylvestris*) wurden in deionisiertem Wasser gewaschen und in der Farbstofflösung dispergiert und geschüttelt; Leica CLSM, Exzitation 488 nm, Emission  $535 \pm 15 \text{ nm}$ , Maßstab = 20 µm. ....27
- Abb. 9: Verteilung von Evans Blau in Sporopolleninkapseln und Pollenkörnern. (A) Sacci sind in Bruchteilen einer Sekunde gefärbt, intakte Zentralkapseln schließen den Farbstoff aus (3 h). (B) wie in (A) wobei im gewählten Ausschnitt verletzte Kapseln überrepräsentiert sind. (C) der Corpus der Pollenkörner schließt Farbstoff länger als 3 h aus. (D) das Cytoplasma intakter



Pollenkörner wird erst nach (3 d) Tagen angefärbt; Sporopolleninkapseln (A, B) und reife Pollenkörner (C, D) von <i>P. sylvestris</i> (A) und <i>P. nigra</i> (B-D). Maßstab = 100 $\mu\text{m}$ .....	28
Abb. 10: Efflux von Dextran T70 aus vorgesättigten Sporopolleninkapseln in reines Wasser. Zum Zeitpunkt Null wurden 304 mg filtrierte Sporopolleninkapseln ( <i>P. sylvestris</i> ), welche zuvor für 30 Tage in einer Lösung von 30 g L <sup>-1</sup> Dextran T70 äquilibrierten, zu 8 mL Wasser im Messsystem gegeben. Pfeil: Kalibrierung mit 200 $\mu\text{L}$ Dextranlösung. In diesem Experiment maß der Verteilungsraum der Dextranmoleküle in der filtrierten Masse 0,66 mL g <sup>-1</sup> .....	29
Abb. 11: Efflux von Zuckern aus zuvor beladenen, mit Flüssigkeit gesättigten Sporopolleninkapseln in reines Wasser. Zum Zeitpunkt Null wurden filtrierte Kapseln (A, 300 mg, <i>P. nigra</i> ; B, 215 mg, <i>P. sylvestris</i> ), die zuvor für 24 h in 0,15 M Zuckerlösung (A, $\alpha$ -Methylglucosid, B, Raffinose) äquilibrierten, zu je 8 mL Wasser in das Messsystem gegeben; Kalibrierung mit 0,2 mL der Inkubationslösung (Pfeil).....	30
Abb. 12: Efflux von Zuckern aus vorgesättigten Kapseln. Die Differenz des finalen ( $\alpha_{\text{max}}$ ) und des aktuellen ( $\alpha_t$ ) Drehwinkels ist gegen die Diffusionszeit ( $1,5 \geq t \geq 5$ ) halb-logarithmisch aufgetragen (vgl. Abb. 11). Das Volumen des langsam austauschenden Raums (Zentralkapsel) wurde für $t = 0$ extrapoliert und betrug für (A) $\alpha$ -Methylglucosid 0,34 (R = 0,93) und für (B) Raffinose 0,30 mL g <sup>-1</sup> (R = 0,99). ....	31
Abb. 13: Zeitabhängige Fraktionierung an Sporopolleninkapseln von optisch aktiven, polydispersen Dextran- und Zuckerlösungen. Größenausschlusschromatographisch erzeugte Elugraphen (A) der polydispersen Dextran-Beprobungslösung (DPS) in ihrem originären Zustand (c) und nach 20 min Efflux (c') aus filtrierten, zuvor mit DPS beladenen Sporopolleninkapseln ( <i>P. sylvestris</i> ), in eine Pufferlösung; die Diffusionszeit ist durch geeignete Kalibrierung in Stokes' sche Radien transformiert. Rechts (B) ist der Austauschquotient $q = c / c'$ für den Efflux nach zwei Zeitintervallen (20 min und 9 h) gegen den Stokes' schen Radius aufgetragen. Das Maximum $q'$ (impermeable Fraktion) wurde aus den Peaks von Dextran T70 an dem Leervolumen der Säule (Superdex HR75, 30 X 1 cm, Pharmacia) erhalten, das Minimum $q''$ (vollständig ausgetauschte Fraktion) wurde aus den $\alpha$ -Methylglucosid-Peaks erhalten; je Elugraph sind drei Austauschraten $\gamma$ bestimmt (punktierte Line). ....	33
Abb. 14: Abhängigkeit des Permeabilitätskoeffizienten (P) von dem Stokes' schen Radius der Zucker und Dextranfraktionen, welche aus vorbeladenen Sporopolleninkapseln der Kiefer abgegeben werden. Zur Verdeutlichung des Wertebereichs ist P logarithmisch angegeben. Messwerte mit gleichem Symbol stehen für Werte, die bei derselben Austauschrate $\gamma$ (● 0,33; ○ 0,50; ■ 0,66) nach verschiedenen langen Diffusionszeiten (vgl. Abb. 13 B, Werte aus Tabelle 5) erhalten wurden. ▲ geben P für $\alpha$ -Methylglucosid und Raffinose, basierend auf Effluxkinetiken (vgl. Abb. 11 A, B) an.....	34
Abb. 15: Hysteresis der Flussratenabhängigkeit des Druck von Festbetten aus Sporopolleninkapseln in Phosphatpuffer. Für die Messung wurde die Flussrate zuerst gesteigert (●) und nach Erreichen des Maximalwerts wieder gemindert (Δ). Die Kapseln ( <i>P. sylvestris</i> ) lassen sich zu druckresistenten Festbetten in eine Leersäule (Pharmacia HR10/30, 1 x 30 cm) packen.....	35
Abb. 16: Elution von polymeren Dextranen unterschiedlicher Molekülmasse, einem Dextran-Albumin-Gemisch und Ethanol an gepackten Sporopolleninkapseln der Kiefer. Dextran T5000 ( $M_r = 5000 \text{ kg mol}^{-1}$ ) wird von nahezu allen Kapselräumen ausgeschlossen (Ausschlussvolumen = Interpartikelvolumen) und hat bei $t_e = \text{ca. } 17,6 \text{ min}$ das Elutionsmaximum (oberstes Elugramm, 1. Peak; vgl. Tabelle 6). Albumin eluiert als zweiter Peak ( $t_e = \text{ca. } 29 \text{ min}$ ) und tauscht auch mit dem Volumen der Luftsäcke aus; Ethanol eluiert als dritter Peak ( $t_e = 56 \text{ min}$ ). Dextran T2000 ( $M_r = 2000 \text{ kg mol}^{-1}$ , $r_s = \text{ca. } 40 \text{ nm}$ ) wird teilweise ausgeschlossen (Interpartikelvolumen); der andere Teil eluiert als zweiter Peak ( $t_e = \text{ca. } 33 \text{ min}$ ) entsprechend dem Volumen der Sacci. Dextran T70 ( $M_r = 70 \text{ kg mol}^{-1}$ , $r_s = 4,56 \text{ nm}$ ) tauscht, wie Albumin, mit den Luftsäcken aus. Für eine scharfe bzw. vollständige Trennung der Molekülgrößenfraktionen von T70 war die Flussrate (0,5 mL min <sup>-1</sup> ) zu hoch (asymmetrische Peaks). Probenvolumen 50 $\mu\text{L}$ , $c = 10 \text{ g L}^{-1}$ Eluent (Phosphatpuffer), 100 % Festbettvolumen (23,7-25,9 mL) in Leersäule (HR10/30, 1 x 30 cm); die Detektion erfolgte refraktometrisch (RI-ERC7512); Kapseln ( <i>P. sylvestris</i> ).....	36
Abb. 17: Elution von Proteinen und niedermolekularen Stoffen aus einem Festbett von gepackten Sporopolleninkapseln. Refraktometrische Detektion von Immunoglobulin (IG, 900 kDa, punktiert), Human Serum Albumin (HSA, 69 kDa, gestrichelt) und Alanin (AS, 88 Da, durchgezogene Linie). Proteine tauschen schnell mit den Luftsäcken, Alanin tauscht langsam mit der Zentralkapsel aus,	

dabei ist $2\sigma$ die Peakbreite bei 60,7 % der Peakhöhe; Probenvolumen 50 $\mu\text{L}$ , 100 % Festbettvolumen = 24,8 mL, Kapseln ( <i>P. sylvestris</i> ), Leersäule (HR10/30, 1 x 30 cm); bei einer Flussrate von 0,5 mL $\text{min}^{-1}$ lastete ein Druck von 3 hPa auf dem Festbett. ....	38
Abb. 18: Abhängigkeit der Trennstufenhöhe von der Flussrate bei der Elution wässriger Lösungen von niedermolekularen Substanzen an gepackten Sporopolleninkapseln. Probenvolumen 50 $\mu\text{L}$ , $c = 10 \text{ g L}^{-1}$ ; Festbettvolumen = 24,5 mL, Kapseln ( <i>P. sylvestris</i> ); $dH/dv$ wurde durch linearen Regression mit $R^2 > 0,9$ erhalten und ist in Tabelle 8 und Tabelle 9 angegeben.....	39
Abb. 19: Verteilung von lyophilisierten Sporopolleninkapseln in wässrigen Emulsionen mit Butanol, Pentanol und n-Heptan. Die Kapseln ( <i>P. sylvestris</i> ) wurden in 0,5 mL Butanol (A), tuschegefärbtem Wasser (B), Pentanol (C) oder n-Heptan (D) gequellt und mit 1 mL Pentanol (B) oder 1 mL tuschegefärbtem Wasser gemischt. Alle Kapseln sind von schwarzgefärbtem Wasser (Chinesische Tusche) bzw. eines Films desselben (D) umgeben. ....	43
Abb. 20: Sporopolleninkapseln aus Ethanol getrocknet und in Wasser gequellt; Kiefer ( <i>P. nigra</i> ). .	44
Abb. 21: Sporopolleninkapseln, aus Wasser getrocknet und darauf in Ethanol gequellt, in Wasser mikroskopiert; ( <i>P. nigra</i> ). ....	45
Abb. 22: Festbettvolumina gepackter Sporopolleninkapseln in unterschiedlichen Flüssigkeiten und in Luft. 1 g Kapseln ( <i>P. nigra</i> ) wurde in den jeweiligen Flüssigkeiten 5 min lang bei einer Beschleunigung von 313 g sedimentiert. Luft: Sedimentvolumen nach Trocknung aus Aceton.....	46
Abb. 23: Titration einer Suspensionen von Sporopolleninkapseln von pH 3 bis pH 11. Die Kapseln (250 mg, <i>P. nigra</i> ) wurden in einer Vorlage (12 mL) von 0,05 M Kaliumsulfat und 3 mM Schwefelsäure suspendiert und mit 0,5 M NaOH titriert. ● – verbrauchte Lauge der Suspension, ○ – verbrauchte Lauge der Vorlage. ....	48
Abb. 24: Vergleich der gravimetrisch bestimmten Verdunstungsraten von wassergesättigten Pollenkörnern und Sporopolleninkapseln. Die Geschwindigkeit der Evaporation aus wässrigen Suspension von: (a) intakten, gequollenen Pollenkörnern (ca. 10 mg TM); (b) Sporopolleninkapseln (ca. 3 mg TM); (c) Verdunstung von reinem Wasser mit Schälchen. Der Wassergehalt der Partikel betrug in beiden Fällen ca. 30 $\mu\text{L}$ ; dargestellt ist die Verdunstungsgeschwindigkeit vor dem vollständigen Austrocknen. * Beginn der intrapartikulären Verdunstung; man beachte die unterschiedliche Strichstärke. Die Evaporation wurde durch eine Lichtquelle (250 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) beschleunigt; Material: <i>P. sylvestris</i> . ....	50
Abb. 25: Sporopolleninkapseln der Kiefer schrumpfen in 5 %iger Natriumpolyacrylatlösung rasch und dauerhaft. Da das Osmotikum von der Zentralkapsel ( <i>P. sylvestris</i> ) ausgeschlossen bleibt, gibt dieselbe Wasser ab und schrumpft, wobei die Luftsäcke sich einander nähern; Osmotikum: Na-Polyacrylat 2100, $c = 50 \text{ g L}^{-1}$ ( $\pi = 0,47 \text{ MPa}$ ). ....	51
Abb. 26: Osmotisch induzierter Efflux von Wasser aus der Zentralkapsel. (A) Änderung der Dextrankonzentration nach der Zugabe von Natriumpolyacrylat. Das polarimetrische Messsystem enthielt 902 mg FM von gepackten, wassergesättigten Sporopolleninkapseln ( <i>P. sylvestris</i> ). Dextrankonzentration, 30 $\text{g L}^{-1}$ ; Volumen außerhalb der Zentralkapsel, 9 mL; Volumen der Zentralkapsel $V_c$ , 322 $\mu\text{L}$ . Bei $t_0$ wurde 0,5 mL einer Dextran/Natriumpolyacrylat-Lösung zugegeben (Endkonzentration von Polyacrylat = 24 $\text{g L}^{-1}$ , $\pi = 0,225 \text{ MPa}$ ). Die Messskala wurde durch Zugabe (Pfeil) von Wasser (100 $\mu\text{L}$ ) kalibriert. (B) Kontrollexperiment, bei dem das Osmotikum zu der Dextranlösung ohne suspendierte Kapseln gegeben wurde. Die transiente Änderung des Drehwinkels wurde durch Schlieren in der Polarimeterzelle verursacht. ....	51
Abb. 27: Abhängigkeit der Kapselschrumpfung vom osmotischen Potential der Natriumpolyacrylat 2100-Lösung. Der Endpunkt der Schrumpfung wurde aus Kurven, wie in Abb. 26, erhalten. ....	52
Abb. 28: Zeitverlauf der Volumenänderung der Zentralkapsel durch isotonische Konzentrationen von Natriumpolyacrylat 2100 und Natriumsulfat. Bei Versuchsende ist der osmotische Druck 0,225 MPa, entsprechend 0,035 M Natriumsulfat bzw. 23,9 $\text{g L}^{-1}$ Natriumpolyacrylat. Der Wasserefflux ist in Prozent des Volumens der Zentralkapsel angegeben. Sporopolleninkapseln wurden aus dem Pollen der Kiefer ( <i>P. sylvestris</i> ) präpariert.....	53
Abb. 29: Integrität der Zentralkapsel vor und nach einem osmotischen Schock. (A) Kontrollpräparation. Nur wenige Kapseln sind (aufgrund von Rissen in der Exine) gefärbt.	

(B) Präparation nach dem Beladen mit Phosphorsäure (Endkonzentration 850 mL L <sup>-1</sup> ) und nachfolgender Überführung in deionisiertes Wasser. Nur wenige Kapseln schließen den Farbstoff (Evans Blau, c = 10 g L <sup>-1</sup> ) aus. Die Sporopolleninkapseln wurden aus Pollenkörnern von <i>P. sylvestris</i> präpariert.	55
Abb. 30: Pollenkorn nach osmotischem Schock. Der denaturierte Gametophyt ( <i>P. nigra</i> ) ist aus der Exine ausgeschleudert worden. Das Pollenkorn wurde langsam mit 85 %iger Phosphorsäure äquilibriert und daraufhin in reines Wasser überführt. Die Fluoreszenzfärbung von Cellulose und Callose mit Calcofluor White (c = 0,1 g L <sup>-1</sup> ) zeigt, dass der Gametophyt von der Intine umgeben bleibt; Fluoreszenz- und LM-Bild desselben Objekts kombiniert (Photoshop 6.0, Adobe, CA, USA).	56
Abb. 31: CLSM-Bilder von reifen Pollenkörnern im Verlauf der Quellung. Optische Äquatorialschnitte (links) und 3D-gerenderte Oberflächen (rechts) der Entfaltung der autofluoreszierenden Exine. (A, a) lufttrocken, (B, b) nach 1 min Quellung, (C, c) nach 3 min Quellung.	57
Abb. 32: Abgabe optisch aktiver Stoffe aus Kiefernpollen, die in verschiedenen Medien rehydratisierten. Zum Zeitpunkt Null wurde 150 mg lufttrockene Pollenkörner ( <i>P. sylvestris</i> ) und 0,4 mL Siliconöl (AS4) zu 10 mL der jeweiligen Flüssigkeit (pH 8) gegeben. Die Zunahme der Dextrorotation im Medium erfolgte hauptsächlich aufgrund Abgabe von Saccharose; exakte Volumina wurden durch Zugabe von 100 µL einer Dextranlösung (30 g L <sup>-1</sup> , 70 kg mol <sup>-1</sup> ) kalibriert; der Referenzwert für 100 % Zuckerabgabe wurde in 50 %igem Ethanol gemessen (0,360°); Polyethylenglykol (PEG 200, M <sub>r</sub> = 200 g mol <sup>-1</sup> ). Man beachte die unterschiedliche Skalierung der Ordinaten.	58
Abb. 33: Abgabe optisch aktiver Stoffe aus quellendem Kiefernpollen an calciumhaltige und calciumfreie Lösungen mit und ohne Vorbehandlung in der Lösung. 150 mg lufttrockene Pollenkörner wurden zum Zeitpunkt Null (Pfeil) in 10 mL Lösung suspendiert: (A) deionisiertes Wasser, (B) 20 mM CaCl <sub>2</sub> , (C) für 1 h in 20 mM CaCl <sub>2</sub> hydriert, dann auf einem Nylonfilter für 10 s gewaschen und anschließend in deionisiertem Wasser überführt; Kalibrierung durch Zugabe von 100 µL Wasser bzw. 3 % Dextran T70; Pollenkörner ( <i>P. sylvestris</i> ).	60
Abb. 34: Abgabe von Zuckern aus quellenden Pollen während der Schwellungsphase nach unterschiedlich langer Vorbehandlung in Lösungen mit niedriger oder hoher Calciumaktivität. 150 mg lufttrockene Pollenkörner ( <i>P. sylvestris</i> ) wurden für verschiedene Zeiten in je 1 mL Lösung, die entweder Na-EDTA (7 mM, pH 8, ■) oder CaCl <sub>2</sub> (20 mM, pH 8, ○) enthielt, gequellt und daraufhin mit einem Überschuss (10 mL) der jeweils anderen Lösung versetzt und für weitere 15 min geschüttelt.	61
Abb. 35: Polarimetrische Bestimmung der Wasseraufnahme und der Abgabe diffusibler Zucker bei der Quellung lufttrockener Kiefernpollen in Dextranlösung oder Wasser. Zum Zeitpunkt Null wurden 150 mg Pollen, zu 10 mL einer (a) Dextran T70-Lösung (30 g L <sup>-1</sup> , 70000 g M <sup>-1</sup> ), oder (c) Wasser gegeben und die Änderung des Drehwinkels (α) aufgezeichnet; Kurve b ist die Differenz (b = a-c) und gibt den Zeitverlauf der Wasseraufnahme an; Kalibrierung erfolgte durch Zugabe von 100 µL Wasser (c) oder Dextranlösung (a).	62
Abb. 36: Wasserabsorptionsraten und relative Wassergehalte von lufttrockenem Pollen, der in Calciumchlorid-Lösungen mit unterschiedlich hohem osmotischen Potential quellt. Zum Zeitpunkt Null wurden 150 mg Pollenkörner in Lösungen (10 mL, 20 mM CaCl <sub>2</sub> ) gequellt, die unterschiedliche Konzentrationen (0,0; 0,1; 0,2 und 0,3 M) von Polyethylenglykol (200 g mol <sup>-1</sup> ) enthielten; ψ <sub>π</sub> ist in MPa angegeben; Pfeile weisen auf den relativen Wassergehalt nach 2 h in der jeweiligen Lösung hin. Die Kurven wurden wie die Kurve b in Abb. 35 erhalten.	63
Abb. 37: Größenabhängigkeit der Permeabilitätskoeffizienten von polymeren Dextranen, Zuckern und niedermolekularen Stoffen an der Nexine der Zentralkapsel; Alkanole (×), Zucker (▲) und Dextranfraktionen (γ = 0,33 ●; 0,50 ○; 0,66 ■; weitere Einzelheiten s. Abb. 14).	67

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Zusammensetzung der Dextran-Beprobungslösung (DPS) .....	21
Tabelle 2: Das Verhältnis zwischen Volumen V und Oberfläche A der Zentralkapsel. Das Verhältnis V/A wurde aus den Durchmessern a, b und c (vgl. Abb. 6) nach Gleichung (4) berechnet. Mittelwerte mit Standardabweichungen, n = Anzahl der Messungen .....	26
Tabelle 3: Verteilungsraum einer filtrierten Masse Sporopolleninkapseln ( <i>P. nigra</i> ) nach dreißigtägiger Inkubation in einer Lösung von Dextran T70 (30 g L <sup>-1</sup> ) .....	30
Tabelle 4: Efflux von Zuckern aus zuvor beladenen Zentralkapseln .....	32
Tabelle 5: Permeabilitätskoeffizienten von verschiedenen großen Dextranmolekülen, denen gemäß definierter Austauschraten und nach Ablauf bestimmter Diffusionszeiten Stokes' sche Radien zugeordnet sind († von Graphen vom Typ der Abb. 13 B abgelesen). Die Werte betreffen die Durchlässigkeit der Zentralkapsel von Exinen der Kiefer ( <i>P. sylvestris</i> L.) .....	34
Tabelle 6: Relatives Elutionsvolumen von polymeren Dextranlösungen an gepackten Sporopolleninkapseln bei unterschiedlichen Flussraten. Die zuerst eluierte Größenfraktion (Peak 1) wird von allen Kapselräumen ausgeschlossen und entspricht dem Interpartikelvolumen. Die im zweiten Peak eluierte Fraktion tauscht neben dem Interpartikelvolumen auch mit dem Volumen der Sacci aus. Probenvolumen 50 µL, c = 10 g L <sup>-1</sup> ; Eluent Standard-Phosphatpuffer, 100 % Festbettvolumen 22,3-22,7 mL (Leersäule HR10/30, 1 x 30 cm), refraktometrische Detektion (RI-ERC7512), Kapseln ( <i>P. sylvestris</i> ) .....	37
Tabelle 7: Kinetische Peakverbreiterung ( $\Delta H / \Delta v$ ) bei der Elution von Dextran T70 an gepackten Sporopolleninkapseln in Abhängigkeit von der Flussrate. Die Peakbreite ( $\sigma$ ) am Elutionsmaximum ( $t_e$ ) liefert die Trennstufenzahl (N). Aus der Abhängigkeit der Trennstufenhöhe (H) von der Flussrate (v), dem Retentionsfaktor (R) und dem Volumen/Oberflächen-Verhältnis der Sacci = 3 µm ergibt sich die Permeabilität (P) der Sacci (Leersäule Pharmacia, HR10/30, 1 x 30 cm, V = 22,62 mL; Probenvolumen 50 µL, c = 10 g L <sup>-1</sup> , Kapseln ( <i>P. sylvestris</i> ) .....	40
Tabelle 8: Kinetische Peakverbreiterung ( $\Delta H / \Delta v$ ) bei der Elution von Alkanolen und Glucose an gepackten Sporopolleninkapseln in Abhängigkeit von der Flussrate. Die Peakbreite ( $\sigma$ ) am Elutionsmaximum ( $t_e$ ) liefert die Trennstufenzahl (N). Retentionsfaktor (R), die Abhängigkeit der Trennstufenhöhe (H) von der Flussrate (v) und das Volumen/Oberflächen-Verhältnis der Kapseln von 5,01 µm ( <i>P. sylvestris</i> ,) ergibt die Permeabilität (P) der Kapselexine. Dabei wurde Dextran T70 bei 67,3 % des Säulenvolumens (Leersäule Pharmacia, HR10/30, 1 x 30 cm, V = 24,43 mL) eluiert; Probenvolumen 50 µL, c = 10 g L <sup>-1</sup> in Phosphatpuffer .....	41
Tabelle 9: Kinetische Peakverbreiterung ( $\Delta H / \Delta v$ ) bei der Elution von niedermolekularen Stoffen und Zuckern an gepackten Sporopolleninkapseln in Abhängigkeit von der Flussrate. Die Peakbreite ( $\sigma$ ) am Elutionsmaximum ( $t_e$ ) liefert die Trennstufenzahl (N). Retentionsfaktor (R), die Abhängigkeit der Trennstufenhöhe (H) von der Flussrate (v) und das Volumen/Oberflächen-Verhältnis der Kapseln ( <i>P. sylvestris</i> , 5,01 µm) ergibt die Permeabilität (P) der Kapselexine. Dabei wurde Dextran T70 bei 67,3 % des Säulenvolumens (Leersäule Pharmacia, HR10/30, 1 x 30 cm, V = 23,09 bis 23,40 mL) eluiert. 50 µL Probenvolumen, c = 10 g L <sup>-1</sup> .....	42
Tabelle 10: Kritische Druckdifferenz für den Eintritt von Luft in den Interpartikelraum von flüssigkeitsgesättigten Betten gepackter Sporopolleninkapseln. Kapseln ( <i>P. nigra</i> ) wurden als Nassbetten (Höhe 25 mm, Durchmesser 7 mm) in Glassäulen gepackt und abnehmendem Luftdruck (Saugspannung) an der unteren Öffnung oder zunehmendem Luftdruck (Kompression) an der oberen Öffnung solange ausgesetzt, bis die kritische Druckdifferenz erreicht war und die mobile Flüssigphase auslief .....	43
Tabelle 11: Quellvermögen von Sporopolleninkapseln in verschiedenen Flüssigkeiten nach dem lichtmikroskopischen Bild. Legende: +, vollständige Quellung (Abb. 21); —, Kapseln nicht voll entfaltet, konkave Oberfläche (Abb. 20); ±, nur einige Kapseln sind vollständig gequollen, Ergebnisse nach Sacci und Zentralkapsel getrennt; Kapseln ( <i>P. nigra</i> ) .....	45
Tabelle 12: Wasserabsorption des Sporopollenins aus Lösungen mit unterschiedlicher Molekülgröße. 200 mg lyophilisierte Exinefragmente ( <i>P. sylvestris</i> ) wurden zu 6 mL der jeweiligen	

Lösung gegeben; die Ausschlussvolumina unterscheiden sich auf dem 95 % Konfidenzniveau signifikant (LSD-Test); n = 5 .....	48
Tabelle 13: Pufferwirkung von Sporopolleninkapseln bei niedrigen und hohen pH-Werten; Kapseln ( <i>P. nigra</i> ), Mittelwerte und Standardabweichung; n = 3.....	49
Tabelle 14: Ultrafilterkoeffizienten ( $L_{PD}$ ) der Exine an der Zentralkapsel für Natriumpolyacrylat. Die prozentuale Schumpfung wurde für verschiedene Inkubationszeiten und osmotische Druckdifferenzen gemessen; Kapseln ( <i>P. nigra</i> ), Osmotikum, Na-Polyacrylat ( $2100 \text{ g L}^{-1}$ ).....	54
Tabelle 15: Ultrafilterkoeffizienten der Exine an der Zentralkapsel. Die Werte für $L_{PD}$ wurden aus Anfangsraten (Inkubationszeit 10 Sekunden) der Schrumpfung erhalten; * individuelle Messung ..	54
Tabelle 16: Prozentuale Abgabe von optisch aktiven Zuckern von quellenden Pollenkörnern in verschiedenen Lösungen nach 10 und 60 min. Die Zuckerabgabe wurde anhand von Polarimeteraufzeichnungen berechnet. 150 mg lufttrockener Pollen ( <i>P. sylvestris</i> ), 6 Monate bei RT gelagert in 10 mL Lösung; n = 5. Die Zuckerabgabe in 50 %igem Ethanol wird als 100 % gesetzt (= $0,360^\circ$ ) .....	59
Tabelle 17: Prozentuale Abgabe von rechtsdrehenden Zuckern bei dem Quellen von unterschiedlich gelagerten Pollenkörner. 150 mg lufttrockene Pollenkörner ( <i>P. sylvestris</i> ) wurden 1 h nach dem Quellen in 10 mL Lösung untersucht. Die Lagerung erfolgte bei $20^\circ\text{C}$ ; n = 5. Die Zuckerabgabe in 50 %igem Ethanol entspricht 100 % .....	59

## Liste der Publikationen

- Bohne G, Woehlecke H, and Ehwald R (2005): Water relations of the pine exine. *Annals of Botany* **96**: 201-208.
- Bohne G, Richter E, Woehlecke H and Ehwald R (2003): The diffusion barrier of tripartite sporopollenin microcapsules prepared from pine pollen. *Annals of Botany* **92**: 289-297.

## Liste der Vorträge und Posterpräsentationen

- Bohne G, Richter E, Ehwald R. (2004/09): Kinetics of water absorption by dehydrated pine pollen in relation to the integrity of the plasmamembrane. *Botanikertagung Braunschweig, Deutschland*: 81.
- Bohne G, Woehlecke H, Richter E, Ehwald R (2002/09): Pores in sporopollenin of the pine pollen - endexine and ectexine. *Botanikertagung Freiburg, Deutschland*: 232.
- Ehwald R, Bohne G, Richter E, Woehlecke H, Lerche D. (2002/09): Functional properties and the technical potential of sporopollenin capsules. Vortrag: *Botanikertagung Freiburg, Deutschland*: 380.
- Bohne G (2002/12): Permeability, porosity and other physicochemical properties of sporopollenin. Vortrag: *XIII Botanischen Graduierten Kolloquium "Havel-Spree-Kolloquium"*, Max-Planck Institut für molekulare Pflanzenphysiologie, Golm, Deutschland.
- Ehwald R, Bohne G, Richter E, Woehlecke H, Lerche D (2002/03): Permeability of sporopollenin capsules prepared from birch and pine pollen. Cell physiology and interactions of biomaterials and matrices. 123-126. 2002, 04. Prag, Tschechische Republik. *COST 840 & X. International BRG Workshop on Bioencapsulation*.
- Bohne G, Woehlecke H, Richter E, Lerche D, Ehwald R (2001): The barrier function of pollen exines for water, low-molecular-weight solutes and polymers. *9th International Cell Wall meeting*. Toulouse, Frankreich: 283.
- Bohne G, Taryono, Zoglauer K (1998/08): Towards construction of synthetic seeds in *Larix decidua* Mill. Vortrag: *COST 822 Physiology and Control of Plant Propagation in vitro*. Lisse, Niederlande: 16.

## Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Rudolf Ehwald für die Überlassung des Themas, die intensive Betreuung während der Arbeit und die vielen, kritischen Diskussionen, die wesentlich zur Erstellung der Dissertationsschrift beigetragen haben.

Ich danke Dr. Siegfried Rogaschewski, Institut für Physik, für die Durchführung der Raster-Elektronenmikroskopie, Dr. Ekkehard Richter für die hilfreiche Assistenz am CLSM, Dr. Yvonne Pörs für die Übersetzung aus dem Russischen, der Dr. Lerche KG (alias LUM GmbH) [http://www.lerche-biotec.com/index.php?goto=products\\_dna](http://www.lerche-biotec.com/index.php?goto=products_dna), insbesondere Dr. Holger Woehlecke, Dr. Oleg Kandarakov und Kristina Lerche für die konstruktive Kooperation, Petra Heese und Heidemarie Schneider für die Unterstützung im Labor und Jürgen Karbe sowie Karlheinz Saft für die technische Unterstützung.

Außerdem danke ich Prof. Dr. Egon Köhler (Arboretum), und Prof. Dr. Michael Hesse, Institut für Botanik der Universität Wien, für die freundliche, fachliche Beratung.

Herzlichen Dank gebührt Prof. Dr. John Rowley, Universität Stockholm, für die großzügige Sendung zahlreicher Separata und die freundlich gewährte Fachkorrespondenz.

## **Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit versichere ich, die vorliegende Dissertation „Ausgewählte Eigenschaften des Sporopollenins der Kiefer“ eigenständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Berlin, den 22. November 2006

Guido Bohne